DIE PHARMAZEUTISCHE VERWENDUNG VON EINSCHLUSSVERBINDUNGEN DER DESOXYCHOLSÄURE (CHOLEINSÄUREN) UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER STABILITÄT UND RESORPTION

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Rudolf Sandmann

aus Rosenberg

Berlin 1970

DIE PHARMAZEUTISCHE VERWENDUNG VON EINSCHLUSSVERBINDUNGEN DER DESOXYCHOLSÄURE (CHOLEINSÄUREN) UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER STABILITÄT UND RESORPTION

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rudolf Sandmann
aus Rosenberg

Berlin 1970

1. Referent: Prof.Dr.K.-H.Frömming

2. Referent: Prof.Dr. G.Schenck

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:

Tag der Promotion:

15. JUNI 1970

Meiner Mutter und meiner Frau

in Dankbarkeit gewidmet

Diese Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K.-H. F r ö m m i n g danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, sowie die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung, insbesondere seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und viele wertvolle Hinweise.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. G. S c h e n c k und Herrn Prof. Dr. F. E i d e n, den Direktoren des Pharmazeutischen Institutes, die durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der zahlreichen Hilfsmittel mir die Arbeit an diesem Institut ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. M. W e n z e l danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit mit Radioisotopen.

Inhaltsverzeichnis

			Seite
I		Einleitung und Problemstellung	1
II		Spezieller Teil	
	1.	Stabilität der Choleinsäuren	12
	1.1	Äußere Einflüsse	12
	1.2	Innere Einflüsse	16
	1.2.1	Hilfsstoff-Zusatz und anschließende Direktkomprimierung	16
	1.2.2	Tablettierung nach Feuchtgranulation	18
	2.	Resorption der Salicylsäure-Choleinsäure	20
	2.1	Löslichkeitsversuche in vitro	20
	2.2	Resorption der Salicylsäure-Choleinsäure bei Ratten	30
	2.2.1	Statistische Auswertung des Tierversuches	35
	2.2.1.1	Standardabweichung s und Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$	35
	2.2.1.2	Signifikanzprüfung der Mittelwerte beider Kurven	36
	3.	Exkretionsuntersuchungen beim Menschen	39
	4.	Diskussion und Zusammenfassung	46

			Seite
III		Experimenteller Teil	
	1.	Darstellung der Einschlußverbindungen	50
	1.1	Linolsäure-Choleinsäure	50
	1.2	Menadion-Choleinsäure	50
	1.3	Salicylsäure-Choleinsäure	51
	2.	Analytische Methoden	
	2.1	Lagerungsversuche bei verschiedenen relativen Feuchten	51
	2.2	Bestimmung der Peroxidzahl	52
	2.3	Manometrische Untersuchungen	53
	2.4	Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes der Hilfsstoffe	54
	2.5	Aufnahme der IR-Spektren	55
	3.	Komprimierungsversuche	56
	4.	Löslichkeitsversuche	56
	4.1	"Dissolution Test" nach Levy	56
	4.2	"Half Change-Methode" nach Münzel	57
	5.	Resorptionsversuche mit ^{14}C markierter Salicylsäure	58
	5.1	Darstellung der ^{14}C-Salicylsäure	58
	5.2	Darstellung der ^{14}C-Salicylsäure-Choleinsäure	58
	5.3	Tierversuche	59
	5.3.1	Applikation	60
	5.3.2	Blutentnahme und Aufbereitung der entnommenen Blutproben	60

		Seite
5.3.3	Messung der Radioaktivität	62
6.	Selbstversuche	62
6.1	Versuchspersonen	62
6.2	Einnahme und Harnentnahme	63
6.3	Bestimmung des Gesamtsalicylats im Harn	64
IV	Literaturverzeichnis	65

I. Einleitung und Problemstellung

Unter der Bezeichnung "Einschlußverbindungen" faßt W. Schlenk jr. (1) eine Reihe von kristallinen Molekülverbindungen zusammen, die eine gleichartige räumliche Lagerung der Komponenten im Einschlußkristall besitzen. Eine der beiden Verbindungskomponenten ist der Strukturträger des kristallinen Grundgitters. Darin befindliche Hohlräume von molekularen Ausmaßen beherbergen den anderen Verbindungspartner. Seine Lage ist nicht immer genau festgelegt. So kann der Partner eine mehr oder weniger große Beweglichkeit besitzen.

Meist ist das Grundgitter ohne den eingeschlossenen Partner nicht beständig, so daß zur Bildung des Kristallgitters die einzuschließende Komponente unbedingt als Vorlage benötigt wird.

Sind die Hohlräume des Gitters nach allen Seiten umschlossen, bildet sich ein Käfig; sind sie eindimensional geöffnet, kommt es zur Bildung von Kanälen; bei einer Öffnung nach zwei Dimensionen entstehen Schichten. Auf Grund dieses geometrischen Aufbaues schlägt Schlenk (1) folgende Einteilung der Einschlußverbindungen vor:

1. Kanal - Einschlußverbindungen,
   zu den u. a. die Harnstoff-, Thioharnstoff-, Desoxycholsäure-und Cyclodextrin - Addukte zählen;
2. Käfig - Einschlußverbindungen,
   mit dem Hydrochinon - Clathrat, dem Dicyano-amminbenzolnickel- oder den Wasser - Käfigverbindungen
   und

3. Schicht - Einschlußverbindungen,
   mit den Tonmineralsorbaten, den basischen Zinksalzen organischer Säuren oder dem Methämoglobinhydrat.

Bei der Bildung dieser Addukte sind hauptsächlich van der Waalsche Bindungskräfte beteiligt. Obwohl die hierbei auftretenden Kräfte relativ schwach sind - sie liegen in der Größenordnung von 1 kcal/Mol - muß man jedoch die räumliche Umhüllung des eingeschlossenen Moleküls zugrunde legen. Unter dieser Berücksichtigung können diese von allen Seiten einwirkenden Nebenvalenzkräfte recht beträchtliche Werte erreichen. Für Harnstoffeinschlußverbindungen (Kanaltyp) findet W. S c h l e n k jr. (2) Bildungswärmen von 5 - 10 kcal/Mol und für Cyclodextrinverbindungen (Kanaltyp) werden von B r o s e r und L a u t s c h (3) 12 kcal/Mol angegeben.

Die hierdurch auftretenden Wechselbeziehungen können bei den eingeschlossenen Gastmolekülen zu Veränderungen führen. C r a m e r (4) fand beim p-Nitrophenol im Dextrin-Addukt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 320 nm nach 430 nm, was der Wellenlänge des Natriumsalzes entspricht. Er deutet dies als eine Lockerung der Elektronensysteme. Beim 1-Isopropylazulen-Cyclodextrin-Addukt wird das Maximum um 30 nm ins Längerwellige verschoben.
S c h e i b e (5) hatte darauf hingewiesen, daß bei der Bildung van der Waalscher Additionsverbindungen eine Verschiebung der Absorptionsmaxima nach längeren Wellenlängen hin zu beobachten ist. Auch ist die fast vollständige Enolisierung von Keto-Enol-tautomeren Verbindungen wie z. B. bei Acetessigester und Acetylaceton in Einschlüssen mit der Desoxycholsäure durch die Arbeiten von S o b o t k a (6,7) bekannt.

Auch zeigt die von mir hergestellte Salicylsäure-Choleinsäure im IR-Spektrum bei 3575 cm^{-1} eine typische nicht assoziierte OH-Valenzschwingung. Diese tritt weder bei der Salicylsäure allein, noch bei anderen Addukten, wie z. B. dem Menadion- oder dem Linolsäure-Addukt auf. (Abb. 1) Es ist daher anzunehmen, daß diese freie OH-Gruppe von der Salicylsäure stammt. Die in diesem Molekül sonst vorhandene Chelatisierung scheint in dem Einschluß unter dem Einfluß der umgebenden Desoxycholsäure-Moleküle aufgehoben zu sein.

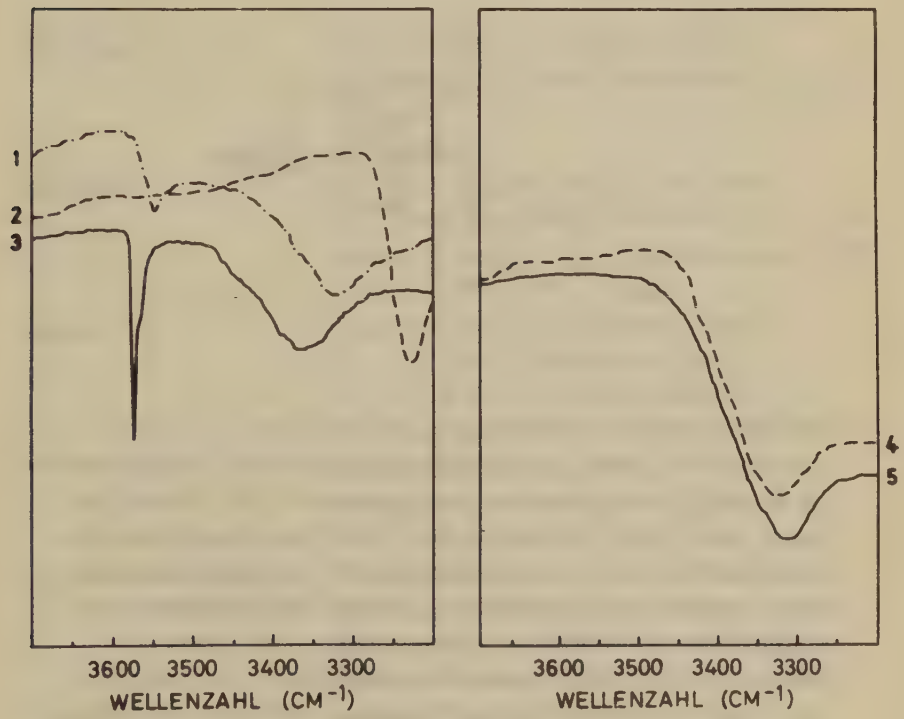
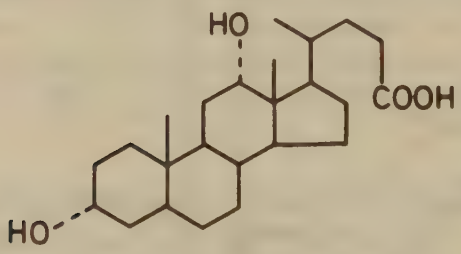


Abb. 1: IR-Spektren von
1. Desoxycholsäure
2. Salicylsäure
3. Salicylsäure-Choleinsäure
4. Menadion-Choleinsäure
5. Linolsäure-Choleinsäure

Die zu den vorliegenden Untersuchungen herangezogenen Addukte der Desoxycholsäure zählen zu den Kanal-Einschlußverbindungen. Sie gehören also zu dem gleichen Typ wie die Harnstoff- und Thioharnstoffverbindungen, über deren Stabilität im Hinblick auf eine pharmazeutische Verwendung ausführliche Untersuchungen von F r ö m m i n g (8,9) durchgeführt wurden.

Diese Addukte der Desoxycholsäure wurden im Jahre 1916 von W i e l a n d und S o r g e (10) entdeckt.



Sie kamen zu der Erkenntnis, daß die von L a t s c h i n o f f (11) 1885 aus der Galle isolierte "Choleinsäure" in Wirklichkeit eine Kombination aus 8 Mol Desoxycholsäure und 1 Mol Fettsäure war. Der Name Choleinsäure, ursprünglich auf ein bestimmtes Produkt der Galle bezogen, wurde als Oberbegriff dieser Adduktklasse geprägt. Die Bezeichnung lautet dann z. B. Xylol-, Campher- oder Stearinsäure-Choleinsäure. Daneben ist aber auch die Bezeichnung Desoxycholsäure-Xylol-Addukt geläufig.

In der folgenden Zeit gelang es, solche Choleinsäuren von den meisten Fettsäuren und einer größeren Anzahl anderer organischer Verbindungen herzustellen.
Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung von einigen Verbindungen aus verschiedenen Stoffklassen, die Choleinsäuren bilden können.

Aliphatische Kohlenwasserstoffe	n-Pentan bis n-Decan, geradkettig und verzweigt (12), n-Undecan bis n-Tritetracontan (13),
Alkohole	n-Octylalkohol, n-Tetradecylalkohol (14), Chaulmoograalkohol (15), Vitamin A (16),
Säuren	C_2 bis C_{29}, gesättigt und ungesättigt, cis-trans-Isomere (10,17,18), Benzoesäure (10), Dicarbonsäuren (19),
Ester	Aliphatische Carbonsäuren von C_1 - C_{15} mit Alkoholen von C_1 - C_{16} (14) z. B. Palmitinsäurecetylester, Behensäure-äthylester (18), Benzoesäure-butylester, 4-Phenylundecylsäure-äthylester (15),
Azo-Verbindungen	p-Aminoazobenzol (20), p-Dimethylaminoazobenzol (21,22), o-Aminoazotoluol, m'-Methyl-p-dimethylaminoazobenzol (23), Methylorange (24)
Ketone	Cinnamoylaceton, Dicinnamoylaceton (17), Acetessigester (6,7), Campher (10,25), Carvon (10),

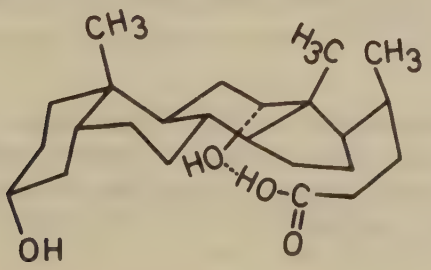
Aromatische Kohlenwasserstoffe	Xylol, Naphtalin, Salol (10), 1,2 Benzanthracen, 1,2,5,6 Dibenzanthracen, Methylcholanthren (26), Phenanthren (17,26)
Steroide	Cholesterin (10), Vitamin D_2 und D_3 (27)

Den entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Molekülstruktur der Choleinsäuren brachten O. K r a t k y und Mitarbeiter (28) mit Hilfe der von ihnen durchgeführten Röntgenstrukturanalyse der Paraffincarbonsäure-Choleinsäuren. Diese Ergebnisse sind inzwischen durch neuere Untersuchungen von F i s c h m e i s t e r (29) bestätigt worden.

Danach zeigen die geradkettigen Fettsäuren von C_4 - C_{26} identische Röntgendiagramme mit identischer Intensitätsverteilung, was auf eine allen gleiche Elementarzelle deutet; diese hat die Ausmaße a = 26,19 Å, b = 13,28 Å, c = 7,46 Å, bestimmt am Beispiel der α-Brom-Stearinsäure-Choleinsäure (29). Die Desoxycholsäure-Moleküle bilden ein Kristallgitter mit zylindrischen Hohlräumen, in welchen die Fettsäuren oder andere acholische Komponenten ihren Platz haben. Aus der Fourier-Analyse (30) ergibt sich in Richtung der c-Achse das in Abb. 2 dargestellte Bild.

Abb. 2: Fourier-Analyse der Fettsäure-Choleinsäuren, Projektion der Elemantarzelle in Richtung der c-Achse [nach Caglioti und Giacomello (30)]

Zwei halbkreisförmig gebogene Desoxycholsäure-Moleküle bilden einen Ring, der einen Hohlraum mit der Gastkomponente im Innern umschließt. Ist die Gastkomponente länger als die Höhe des Desoxycholsäure-Moleküls, kann sie als Rückgrat für einen weiteren Ring dienen. So entstehen Choleinsäurezylinder mit gradzahligen Koordinationszahlen. Ermöglicht wird dieses Bauprinzip durch die A/B cis-Konfiguration des Desoxycholsäure-Moleküls, welches dadurch halbkreisförmig gebogen ist.



Nach F i s c h m e i s t e r (29) wird der enge Zusammenhalt des Zylinders durch Wasserstoffbrückenbindung der endständigen Karboxylgruppe mit der 3-ständigen Hydroxylgruppe des gegenständigen Desoxycholsäure-Moleküls aus der nächsthöheren Elementarzelle bewirkt. Dadurch entsteht eine spiralige Anordnung der Desoxycholsäure-Moleküle (Abb. 3).

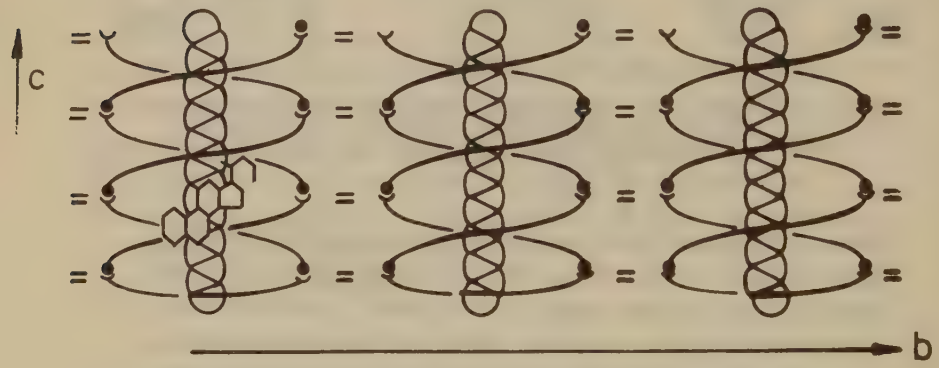


Abb. 3: Spiralige Anordnung der Desoxycholsäure-Moleküle, im Innern eine Fettsäure umschließend.

{ Wasserstoff-Brücken zwischen 3-OH und 24-COOH zweier Desoxycholsäure-Moleküle einer Spirale.

= Wasserstoff-Brücken zwischen den Karboxylgruppen der parallel verlaufenden Spiralen

(nach F i s c h m e i s t e r (29), geändert)

Darüber hinaus kommt es auch zu einer engen Verknüpfung der parallel angeordneten Kanäle durch die Wasserstoffbrückenbindung der einander sehr nahe kommenden Seitenketten-Karboxylgruppen.

Hinsichtlich einer praktischen Anwendung solcher Addukte sei die Möglichkeit der Trennung optisch aktiver Substanzen erwähnt, wie sie von S o b o t k a und G o l d b e r g am Beispiel der Bildung von Choleinsäuren mit linksdrehendem Campher, Phenyläthyläthanol oder Methylessigsäure gezeigt wurde (31). Weiter ist es möglich, in Wasser schwer oder gänzlich unlösliche Stoffe wie Naphthalin, Xylol und Cholesterin durch eine wässrige Lösung von Natriumdesoxycholat in Lösung zu bringen.

Auf pharmazeutischem Gebiet eröffnen sich vielseitige Anwendungsmöglichkeiten. W i e l a n d und S o r g e berichteten, daß Benzaldehyd in solchen Addukten vor einer Oxydation geschützt ist, sie wiesen auch bereits darauf hin, daß Choleinsäuren mit stark riechenden Komponenten vollkommen geruchlos sind (10). Auch ein schlechter Geschmack einer eingeschlossenen Verbindung kann auf diese Weise unterdrückt werden.

Durch die Möglichkeit, daß auch flüssige Verbindungen Choleinsäuren bilden, wie z. B. ungesättigte Fettsäuren, könnten diese in feste Arzneiformen weiter verarbeitet werden.

In der Literatur wird bisher nur vereinzelt über die pharmazeutischen Verwendungsmöglichkeiten berichtet.

S h i m i z u und H a t a k e y a m a stellten eine Vitamin A-Choleinsäure her, die sich als sehr licht- und luftbeständig erwies und im Tierversuch bei Mäusen eine stärkere Wirkung (Gewichtszunahme) zeigt, als das Vitamin A allein (16). Zu ähnlichen Ergebnissen kam

W a k e l y bei der Fütterung von Küken mit Vitamin A-acetat-Choleinsäure (34). Er verglich mit der gleichen Menge Vitamin A in Form des "USP Reference Vitamin A Oil" und stellte dabei eine stärkere Gewichtszunahme nach Applikation der Choleinsäure fest. Der Autor macht dafür die bessere Verwertung (Resorption) des Vitamins in der Form des Adduktes verantwortlich. Gleichzeitig konnte er bei Ratten nach Gaben von Vitamin A-acetat-Choleinsäure in der Leber mehr Vitamin A-Einheiten nachweisen. Besonders interessant sind die Addukte mit dem Vitamin K. A l m q u i s t und K l o s e (35) stellten erstmals eine Choleinsäure des Vitamin K her; sie fanden, daß nach oraler Verabfolgung an Küken eine hohe Vitamin K-Aktivität vorliegt. In einem Patent teilte die Firma H o f f m a n n - L a R o c h e AG die Herstellung einer Choleinsäure mit dem 2-Methyl-naphthochinon-1,4 mit (36). Da lipophile Stoffe nur in Gegenwart von Gallensäure aufgenommen werden, kommt den Vitamin K-Choleinsäuren medizinische Bedeutung zu. Fehlt die Galle im Darm z. B. infolge einer Gallenfistel oder eines mechanischen Verschlusses der Gallenwege, kann es bei Tier und Mensch zur Ausbildung einer "Resorptions-K-Avitaminose" kommen (37). Die Tatsache, daß die Faezes des Säuglings fast frei von Gallensäuren sind, ist eine der Ursachen für die Häufigkeit von K-Mangelerscheinungen in den ersten Lebenstagen (38). Ähnliche Ergebnisse wurden von C i l e n t o hinsichtlich der Desoxycholsäure-Addukte der Vitamine K_1 und K_3 berichtet (39).

Weiterhin liegt in dem Präparat Degalol^R ein Menthol-Addukt der Desoxycholsäure vor (40). Auch vom Vitamin D_2 und D_3 gibt es Choleinsäuren. Sie zeichnen sich durch Stabilität und gute Wasserlöslichkeit aus (27).

Ich werde in der vorliegenden Arbeit zunächst einige Fragen der Stabilität, die bei der Verarbeitung von Einschlußverbindungen der Desoxycholsäure mit einigen ausgewählten Modellsubstanzen in Arzneiformen von Wichtigkeit sind, untersuchen. Dabei werden sowohl äußere Einflüsse, wie auch eine mögliche Beeinflussung durch Hilfsstoffe berücksichtigt.

Weiterhin werden Untersuchungen über die Resorption dieser neuen Arzneiform bei Tier und Mensch durchgeführt.

II. Spezieller Teil

1. Stabilität der Choleinsäuren

Bevor ein Arzneistoff zu einer geformten Zubereitung verarbeitet werden kann, müssen die chemischen und physikalischen Veränderungen erkannt werden, die durch äußere Einflüsse, wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Licht hervorgerufen werden. Darüber hinaus kann die Stabilität durch innere Ursachen der Zubereitung beschränkt sein. Hier sind vor allem gegenseitige Beeinflussungen zwischen Wirkstoffen und zwischen Wirk- und Hilfsstoffen zu berücksichtigen.

Es ist anzunehmen, daß Einschlußverbindungen so lange stabil sind, so lange die äußere Einschlußhülle, das heißt die Wirtskomponente, nicht beschädigt ist. Es sollten daher bei der Verarbeitung derartiger Addukte solche Einflüsse auf alle Fälle ausgeschaltet werden, die einen negativen Einfluß auf die Stabilität der Wirtskomponente ausüben können.

1.1 Äußere Einflüsse

Untersuchungen in unserem Arbeitskreis hinsichtlich der Stabilität der Harnstoff-Addukte hatten ergeben, daß derartige Einschlußverbindungen bis zu einer relativen Feuchte von 70 - 75% bedenkenlos gelagert werden können, ohne daß es zu einer Zersetzung kommt (9). Andererseits hatte jedoch der Wassergehalt zugesetzter Hilfsstoffe einen sehr negativen Einfluß auf die Stabilität, so daß Harnstoff-Einschlußverbindungen nur mit praktisch wasserfreien Hilfsstoffen verarbeitet

werden sollten. Diese Ergebnisse sind verständlich, da der Harnstoff ja eine relativ wasserlösliche Verbindung darstellt.

Dagegen konnte angenommen werden, daß Choleinsäuren gegenüber Feuchtigkeitseinflüssen recht stabil sind, da Desoxycholsäure bis zu einem pH-Wert von etwa 5,5 in Wasser weitestgehend unlöslich ist.

Für die Untersuchungen des Feuchtigkeitseinflusses auf die Stabilität der Choleinsäuren wurde als Modell die Linolsäure-Choleinsäure gewählt.

Die Wahl dieser Verbindung geschah vor allem aus analytischen Gründen. Eigene Untersuchungen ergaben, daß die Linolsäure im Addukt völlig stabil ist. Dies läßt sich mittels der Peroxidzahlbestimmung und des manometrischen Sauerstoffverbrauchs zeigen. Wird sie jedoch aus dem Addukt freigesetzt, so beginnt sehr schnell die Autoxydation. Folglich kann mit diesen beiden Methoden leicht eine Zersetzung der Choleinsäure analytisch verfolgt werden.

Die Linolsäure-Choleinsäure wurde zu diesem Zweck bei 20° relativen Feuchten von 12,3% - 97% ausgesetzt. Durch Gewichtskontrollen wurde so lange die Wasseraufnahme verfolgt, bis Einstellung des Gleichgewichts zwischen der relativen Luftfeuchtigkeit und dem Wassergehalt der Proben eingetreten ist, d. h. bis innerhalb einer Woche keine Gewichtsänderung mehr auftritt (= Gleichgewichtswassergehalt). Aus den erhaltenen Werten läßt sich die Sorptionsisotherme zeichnen (41).

Dabei zeigte sich das Linolsäure-Addukt während der Beobachtungszeit von 20 Monaten völlig indifferent. Eine zweite Versuchsreihe unter erschwerten physika-

lischen Bedingungen, wie höhere Temperatur (45°) und größerer Feuchtigkeitsgehalt der Luft (80%) zeigte ebenfalls keine Wasseraufnahme.

Vergleichsweise mit Salicylsäure- und Menadion-Choleinsäure gemachte Lagerversuche bestätigten die obigen Ergebnisse. Das Erstellen einer Sorptionsisotherme wurde damit hinfällig. Lediglich die Desoxycholsäure allein neigt zu einer geringen Wasseraufnahme, die sich jedoch auch erst bei höheren relativen Feuchten stärker bemerkbar macht. (Tab. 1)

Relative Feuchte	68%	88%	100%
Wassergehalt [%]	0,46	1,63	5,2

Tabelle 1: Zunahme des Wassergehalts [%] der Desoxycholsäure nach 7-wöchiger Lagerung bei 20° in Abhängigkeit von der relativen Feuchte.

Parallel zu den Versuchen der Feuchtigkeitsaufnahme wurden die Peroxidzahlen und der Sauerstoffverbrauch der bei verschiedenen relativen Feuchten gelagerten Linolsäure-Choleinsäure-Proben bestimmt, um festzustellen, ob die Addukte noch jeweils stabil sind. Die Peroxidzahlbestimmungen der bei 20° und relativen Feuchten bis 97% gelagerten Proben wiesen auf völlige Stabilität des Adduktes hin. Auch die unter erschwerten Bedingungen gelagerten Proben (45°, Φ = 80%) blieben unzersetzt. Es wurden keine Peroxidzahlen größer als 0 erhalten.

Zum Vergleich ergab Linolsäure, die unter Stickstoff aufbewahrt worden war, nach 2-tägigem Stehen an der Luft bereits eine Peroxidzahl von 770.

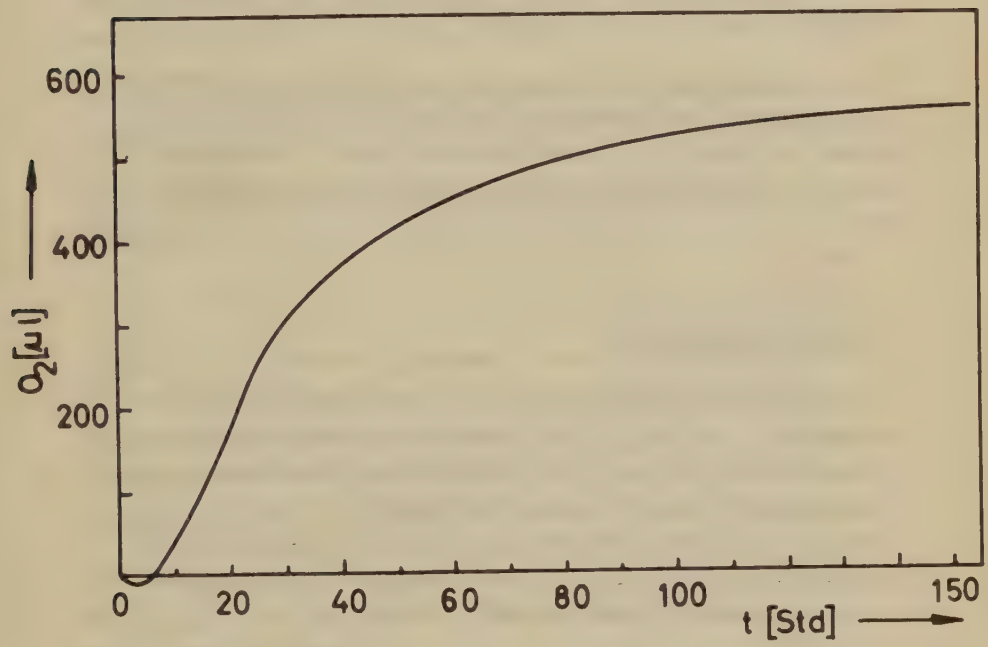


Abb. 4: Manometrische Verfolgung der Autoxydation der Linolsäure(4 mg; 37°)

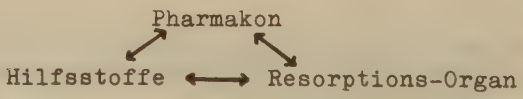
Abb. 4 zeigt den manometrisch bestimmten O_2-Verbrauch der Linolsäure an der Luft. Nach einer kurzen Induktionsperiode werden rasch steigende Mengen Sauerstoff aufgenommen. Gleiche Mengen Linolsäure im Linolsäure-Addukt ergaben unter gleichen Bedingungen über einen Untersuchungszeitraum von 3 Wochen keinen Sauerstoffverbrauch. Dies weist ebenfalls auf eine völlige Stabilität des Adduktes hin.

Im Hinblick auf eine Tablettierung der Substanz führte ich Komprimierungsversuche durch, um eine eventuell hierbei auftretende Destruktion festzustellen. Das Linolsäure-Addukt wurde dabei 5 Minuten einem Druck von 300kg/cm^2 ausgesetzt. Der hierbei entstandene Preßling war hornartig fest.

Nach sorgfältiger Zerkleinerung wurde durch manometrische Messung festgestellt, daß keine Sauerstoffaufnahme erfolgte. Der Einschluß war stabil geblieben, so daß keine Zerstörung des Kristallgitters eingetreten war.

1.2 Innere Einflüsse

Um aus einem Pharmakon eine applizierbare Arzneiform zu machen, ist meist der Zusatz mehrererHilfsstoffe notwendig. Dabei gilt als wichtigster Grundsatz, daß diese Stoffe physiologisch unbedenklich sein müssen, und die Inhaltsstoffe der Tablette nicht nachteilig beeinflussen dürfen. Das eben Gesagte läßt sich gut als Dreieckverhältnis darstellen (42).



1.2.1 Hilfsstoff-Zusatz und anschließende Direktkomprimierung

Als Hilfsstoffe kamen solche Verbindungen in Betracht, die vor allem in der Granulat- und Tablettenherstellung häufig verwendet werden, wobei jeweils deren Feuchtigkeitsgehalt mit berücksichtigt wurde, und

die auch von mir selbst zur anschließenden Herstellung der Tabletten verwendet wurden. Auf Grund der vorhergehenden Versuche war allerdings anzunehmen, daß auch der Feuchtigkeitsgehalt der Hilfsstoffe keinen negativen Einfluß auf die Stabilität der Choleinsäuren ausübt.

Als Modellsubstanz diente auch hier das Linolsäure-Addukt.

Folgende Hilfsstoffe und Hilfsstoffgemische kamen zum Einsatz:

	Wassergehalt
Kartoffelstärke	15,8%
Granulatum simplex ad tablettas - Pharmakopoea Danica 1948 III	12,6%
mikrokristalline Cellulose, Avicel ^{R}	4,5%
Laktose	1,4%
Talcum siliconisatum = 9 Teile Talcum und 1 Teil Silikonöl	0,1%

Diesen Stoffen wurde jeweils 10% des Linolsäure-Adduktes durch intensives Mischen zugesetzt. Ein Teil dieser Mischung wurde manometrisch bei 37° auf eine etwa auftretende Sauerstoffaufnahme untersucht, während ein anderer Teil ohne Granulierung zu Tabletten gepreßt wurde (Härte der Tabletten 4-5 kg/cm^2, bei der Mischung mit Avicel^{R} > 15 kg/cm^2), um dann nach der Zerkleinerung ebenfalls auf die Stabilität der Choleinsäure untersucht zu werden.

Während der Beobachtungszeit von 7 Tagen, in einzelnen Fällen bis 3 Wochen, konnte kein Sauerstoffverbrauch festgestellt werden. Die Einschlußverbindung wurde also weder durch die zugemischten Hilfsstoffe, noch durch die anschließende Komprimierung geschädigt.

1.2.2 Tablettierung nach Feuchtgranulation.

Nach den Erfahrungen, die mit dem Zusatz einfacher Hilfsstoffe zur Linolsäure-Choleinsäure gemacht wurden, sollte nun die Stabilität des Adduktes nach einer Feuchtgranulierung mit wässrigen Granulationsflüssigkeiten, geprüft werden.

Mit folgenden Bindemitteln wurde granuliert:

10%ige wässrige Gelatinelösung, 10%ige Gummi arabicum-Lösung, 10%iger Stärkekleister und 10%ige Lösung von Aerosil comp.^{R}
Der Gehalt an Linolsäure-Addukt betrug jeweils 10%, der Füllmittelzusatz (Stärke 7 Teile, Lactose 3 Teile) 80% und der Gleit- und Sprengmittelzusatz (Mischung gleicher Teile Talcum siliconisatum und Kartoffelstärke) 10%.

Die maximalen Gewichtsabweichungen bei der Feuchtgranulierung betrugen bis $\pm$ 3% mit den stärkehaltigen Granulationsflüssigkeiten, sonst lagen sie bei wesentlich niedrigeren Werten. Die Härte der Tabletten betrug 4 - 5 kg/cm^2. Die Zerfallszeiten lagen zwischen 10 und 90 Sekunden. Die Stabilität des Linolsäure-Adduktes in den so hergestellten Tabletten wurde durch die Peroxidzahlbestimmung verfolgt.

Eine sofort nach der Tablettenherstellung und nach 3 Wochen gemachte Untersuchung erbrachte keinen Sauerstoffverbrauch. Auch nach 20-monatiger Lagerung war die Stabilität noch vollständig erhalten geblieben. Die verwendeten Bindemittel hatten also keinen negativen Einfluß auf die Stabilität.

Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen zeigen, daß äußere Kriterien wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und hoher Kompressionsdruck die Haltbarkeit der Choleinsäuren nicht negativ beeinflussen. Auch der Zusatz von Hilfsstoffen, die Herstellung von Granulaten mit wässrigen Bindemittellösungen, wie auch die Komprimierung dieser Gemische führte zu keiner Schädigung der Einschlußverbindungen.

2. Resorption der Salicylsäure-Choleinsäure

Die galenische Aufgabe in der Arzneimittelentwicklung ist nicht mit der Fertigstellung der Arzneiform allein getan. Ein wesentliches Augenmerk gilt darüber hinaus den Beziehungen zwischen der Applikation des Arzneistoffes, der Resorption des Wirkstoffes aus der Arzneiform und der Wirkung und dem Abbau des Pharmakons im Organismus. Dieser Vorgang setzt sich naturgemäß aus einzelnen Teilvorgängen zusammen, wie Liberation des Wirkstoffes aus der Arzneiform, Diffusion, Penetration und Permeation der Wirkstoffe durch die Resorptionsorgane und die Distribution im Körper. Der dynamische Gang des Wirkstoffes im Organismus endet in den vielfältigen Möglichkeiten der Elimination. Die Beobachtung der Konzentrationsabläufe der Pharmaka bei der Applikation im Organismus und das biochemische "Schicksal" des Pharmakons im Organismus ("fate of drugs"), sind als neue Aufgabengebiete in die galenische Forschung eingerückt. Die für dieses Teilgebiet neu gewählte Bezeichnung Pharmakokinetik läßt sich dem umfassenden Begriff Biopharmazie unterordnen (44).

2.1 Löslichkeitsversuche in vitro

Für die in diesem Kapitel untersuchte Resorption der Gastkomponente von Choleinsäuren mußte entsprechend dem natürlichen Vorbild durch in vitro Versuche die Freigabe dieser aus den Einschlußverbindungen aufgeklärt werden.

Für die Resorption eines Wirkstoffes ist seine Löslichkeit eine wichtige Voraussetzung, da - von Ausnahmen abgesehen - nur ein gelöster Stoff resorbiert

werden kann. Deshalb muß zunächst der genaue Verlauf der Wirkstofffreigabe, d. h. die Lösungsgeschwindigkeit, unter den pH-Bedingungen des Magen-Darm-Kanals verfolgt werden.

Als Modellsubstanzen wurden die Salicylsäure und das 2-Methyl-naphthochinon-1,4 (Menadion) in ihren Choleinsäuren herangezogen.

Die Auswahl dieser Stoffe wurde auf Grund geeigneter Löslichkeiten und der leichten analytischen Erfaßbarkeit vorgenommen. Die Lösungsgeschwindigkeit der genannten Gastkomponenten aus dem Addukt wurde im "dissolution test" nach L e v y (45) bei bestimmten pH-Werten ermittelt; sie wurde mit der Lösungsgeschwindigkeit der Modellsubstanz allein, und der Mischung entsprechender Mengen Desoxycholsäure und Modellsubstanzen verglichen. Die Abbildungen 5 und 6 a-d zeigen die Lösungsgeschwindigkeiten bei pH 1,0 , pH 4,5 , pH 7,5 und pH 8,5.

Es zeigt sich, daß die Salicylsäure-Choleinsäure im sauren Bereich, auf alle Fälle zwischen pH 1,0 und pH 4,5, weitgehend stabil ist. Es erfolgt kein Übergang der Salicylsäure aus dem Addukt in die Lösung. Dagegen hat die Salicylsäure allein und im Gemisch mit der Desoxycholsäure bei den eingesetzten Konzentrationen eine recht gute Löslichkeit (85 - 90%). Aber schon bei pH 7,5 ist die Freigaberate aus dem Addukt beträchtlich gestiegen (63% nach 1 Stunde), und bei pH 8,5 sind nach 1 Stunde 66% der Salicylsäure aus dem Addukt in die Lösung gegangen.(Abb.5a-d)

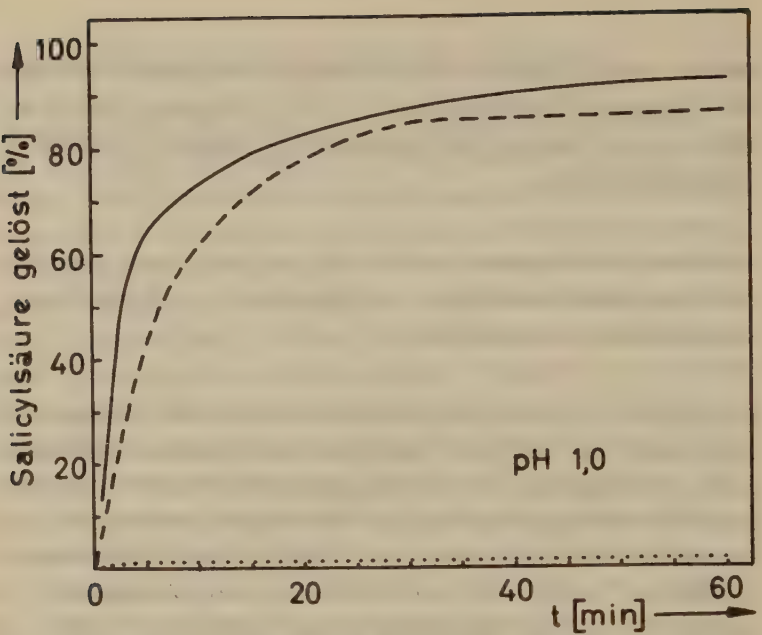
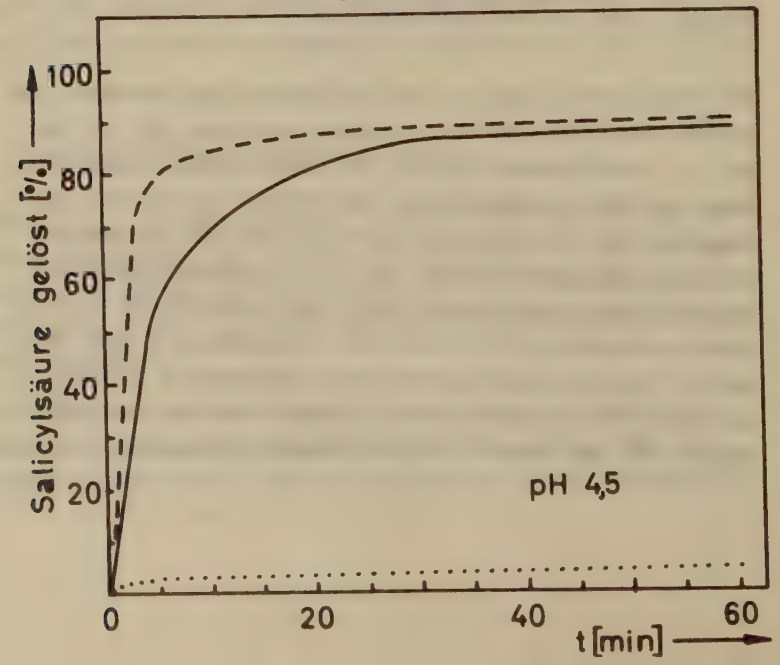


Abb. 5: "Dissolution test" der Salicylsäure-Choleinsäure
a = pH 1,0 b = pH 4,5

190 mg Salicylsäure
190 mg Salicylsäure + 560 mg Desoxycholsäure
750 mg Salicylsäure-Choleinsäure



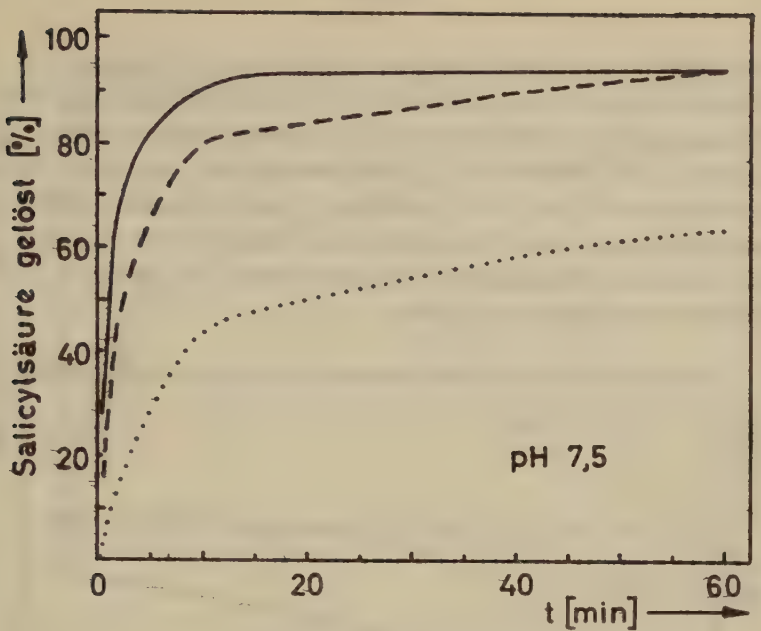
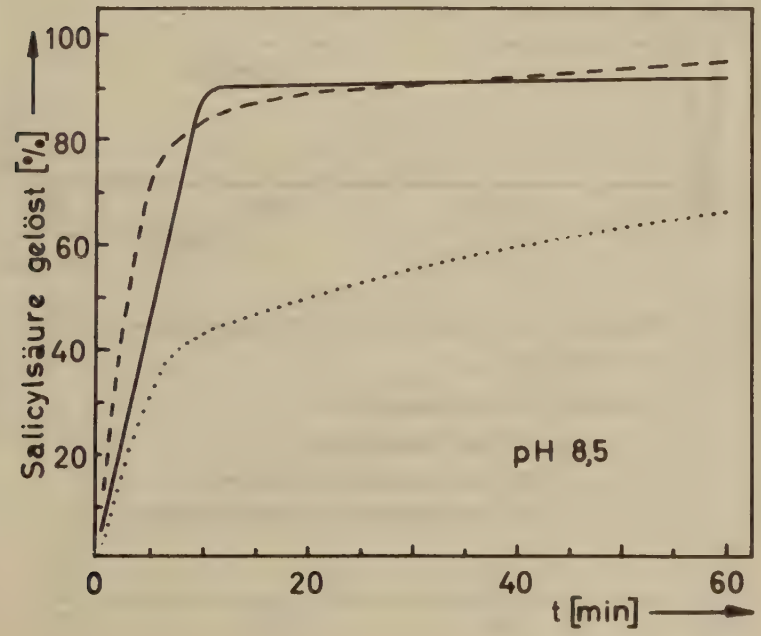


Abb. 5: "Dissolution test" der Salicylsäure-Choleinsäure
c = pH 7,5 d = pH 8,5



Das Menadion-Addukt, Abb. 6a - d, zeigt im sauren Gebiet ebenfalls weitgehende Stabilität. Auffallend ist die bei allen pH-Bereichen beobachtete erhöhte Löslichkeit des Menadions in dem Gemisch mit der Desoxycholsäure. Bei pH 7,5 beginnt die Liberation der Gastkomponente aus dem Addukt und erreicht bei pH 8,5 die gleiche Lösungsgeschwindigkeit wie sie in der Mischung zu beobachten ist.

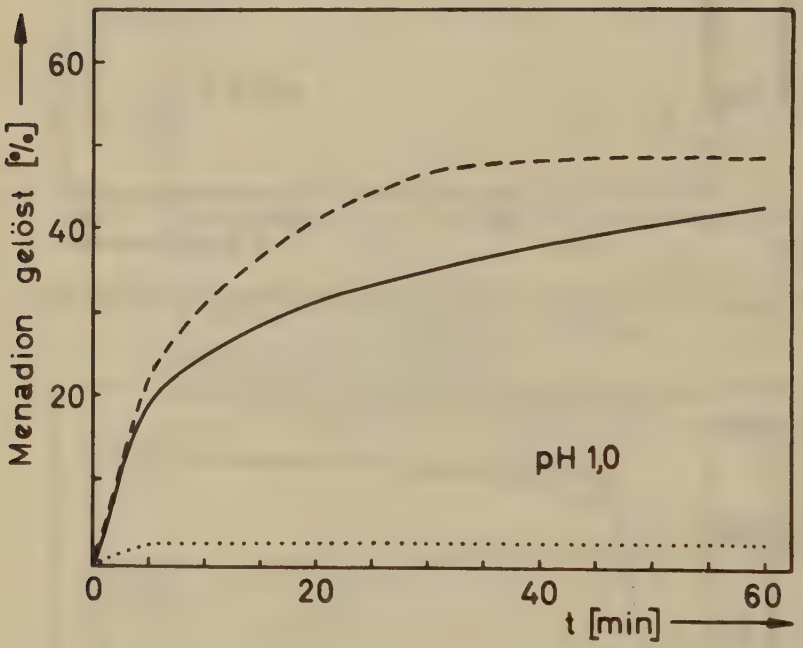


Abb. 6: "Dissolution test" der Menadion-Choleinsäure
a = pH 1,0

——— 57 mg Menadion
- - - - 57 mg Menadion +
288 mg Desoxycholsäure
····· 345 mg Menadion-Choleinsäure

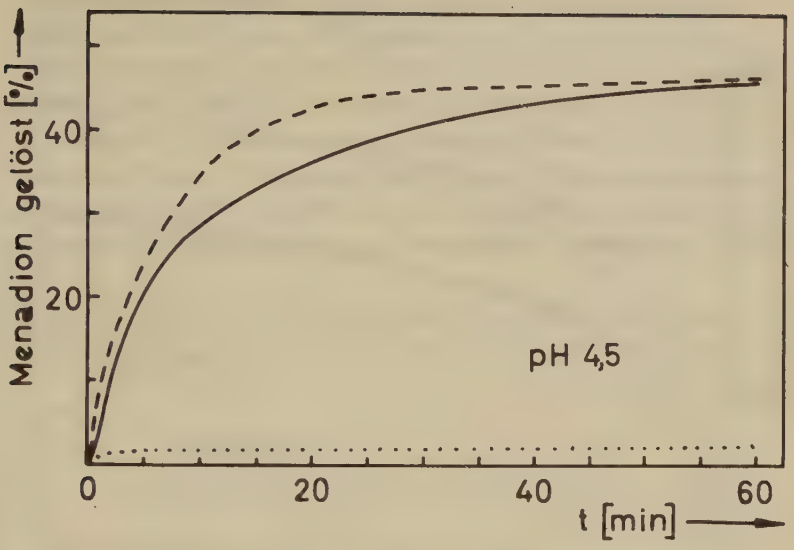
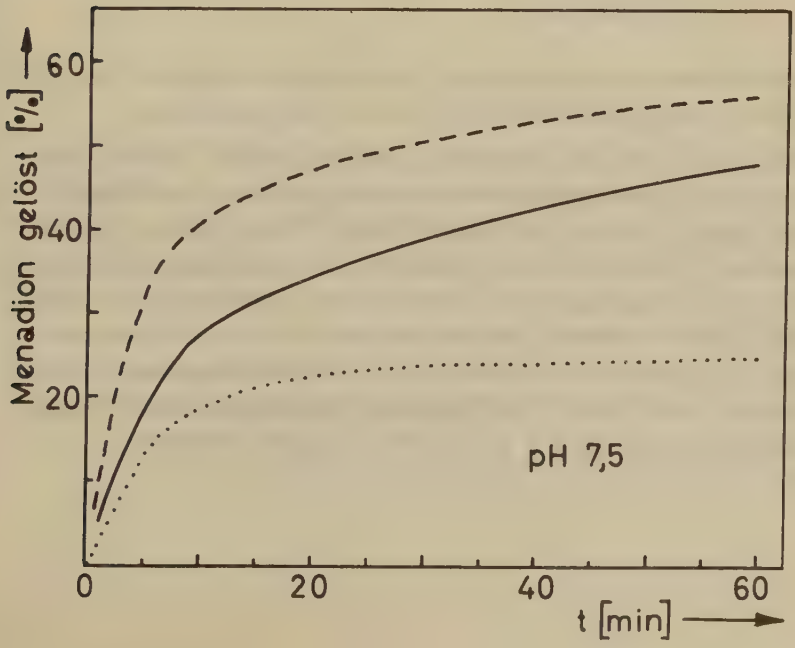


Abb. 6: "Dissolution test" der Menadion-Choleinsäure
b = pH 4,5 c = pH 7,5



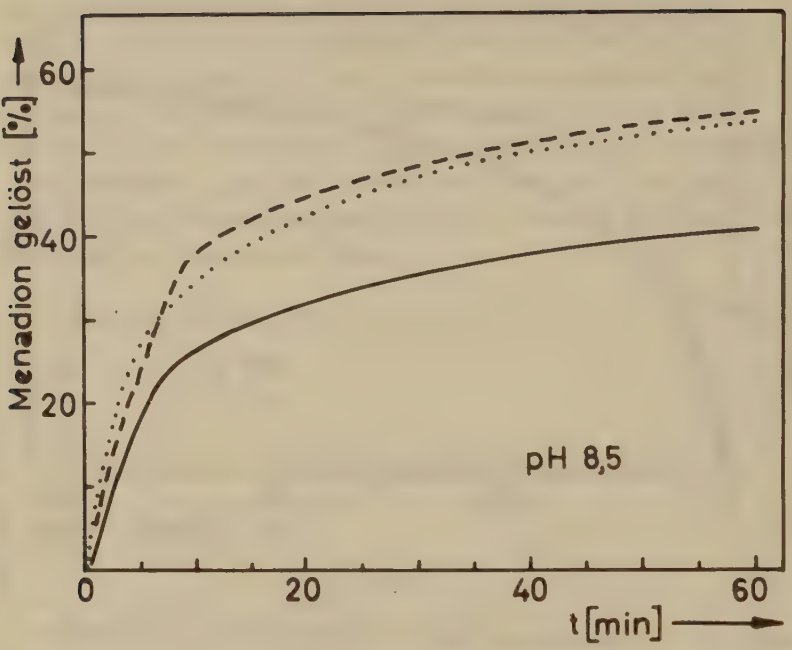


Abb. 6: "Dissolution test" der Menadion-Choleinsäure
d = pH 8,5

Auffallendes Ergebnis der Löslichkeitsversuche ist die große Säurestabilität der Einschlußverbindungen.

Meist ist mit der Anwendung säurestabiler Arzneiformen auch eine verzögerte Wirkstofffreisetzung verbunden. Um einen solchen möglichen Depot-Effekt festzustellen, wurde eine weitere in vitro-Methode herangezogen, die dem physiologischen Verlauf der pH-Änderung in Zeitabhängigkeit während des Verweilens der zu untersuchenden Substanz oder Arzneiform im Magen-Darm-Kanal möglichst nahe kommt. Die von mir angewandte "Half Change-Methode" nach M ü n z e l (46) erlaubt während

der Beobachtungszeit von 8 Stunden, ohne Berücksichtigung weiterer physiologischer Faktoren, die Löslichkeitscharakteristik des Wirkstoffes allein in Abhängigkeit von den pH-Werten des Magen-Darm-Kanals zu ermitteln. Dabei wird nach jeder Stunde die Hälfte des ursprünglich eingesetzten Magensaftes durch künstlichen Darmsaft ersetzt und der pH-Wert immer mehr in Richtung zu dem des reinen Darmsaftes verschoben.

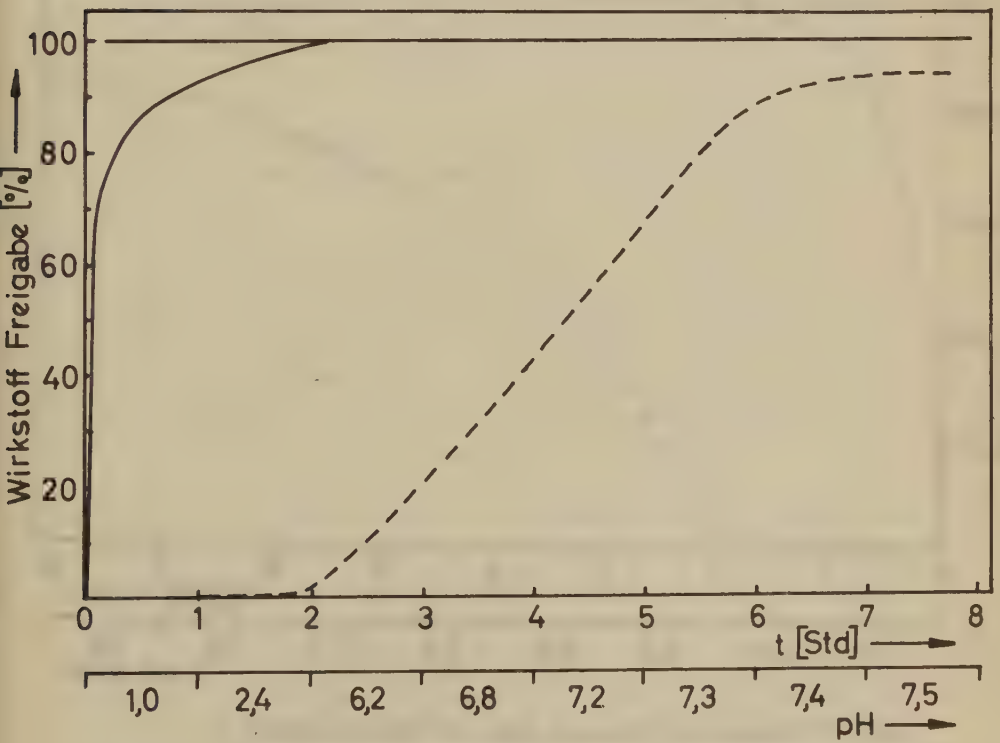


Abb. 7 : Salicylsäure-Freigabe aus der Choleinsäure nach der "Half Change-Methode" bei 37°

——— 190 mg Salicylsäure
- - - - 750 mg Salicylsäure-Choleinsäure

Wie aus den Abb. 7 und 8 zu ersehen ist, beginnt die Wirkstofffreisetzung erst beim Übergang vom Sauren ins Neutrale bis schwach Alkalische. Die vergleichsweise ermittelte Löslichkeit des ungebundenen Wirkstoffes läßt deutlich die Lösungsverzögerung in Form der Choleinsäure erkennen.

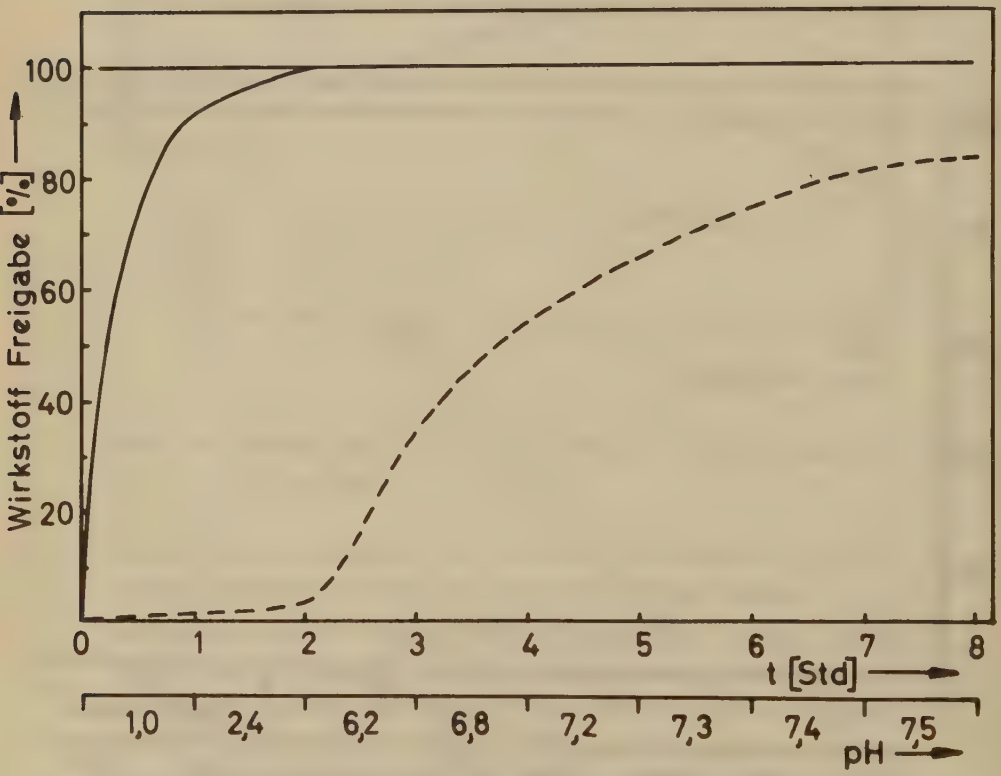


Abb. 8: Menadion-Freigabe aus der Choleinsäure nach der "Half Change-Methode" bei 37°

——— 57 mg Menadion
- - - - 345 mg Menadion-Choleinsäure

Die vorliegenden in vitro-Untersuchungen lassen die

Verwendung von Choleinsäuren als eine magensaftresistente Wirkstofform für möglich erscheinen. Zusätzlich wurde eine verzögerte Wirkstofffreisetzung gefunden.

2.2 Resorption der Salicylsäure-Choleinsäure bei Ratten

Über die Eignung einer magensaftresistenten Arzneiform kann niemals die in vitro-Methode allein entscheiden. Viele physiologische Faktoren können die Resorption im tierischen oder menschlichen Körper beeinflussen. Es seien hier nur die unterschiedliche Verweildauer des Pharmakons im Magen-Darm-Kanal je nach der Fülle des Verdauungstraktes, die individuellen Schwankungen der pH-Werte im Magen und Darm, die unterschiedliche Kontraktilität, die variierende Salzkonzentration oder der wechselnde Gehalt an Magenschleim erwähnt.

Daher wurde zunächst im Tierversuch bei Ratten das Verhalten der Choleinsäuren untersucht. Hierdurch sollten folgende Fragen geklärt werden.

1. Kann die in vitro festgestellte Magensaftresistenz der Choleinsäuren im Tierversuch bestätigt werden?
2. Sind die pH-Werte des Darmtraktes ausreichend, die Gastkomponente aus dem Addukt freizusetzen?
3. Kommt es dementsprechend zu einer verzögerten Resorption des Pharmakons aus dem Addukt gegenüber der Applikation des freien Pharmakons?

Dazu wurde einer Versuchsgruppe Wistar-Ratten mit ^{14}C markierte Salicylsäure, einer anderen Gruppe ^{14}C markierte Salicylsäure-Choleinsäure peroral verabfolgt. Die Dosis betrug 8 mg Salicylsäure pro Tier (Aktivität 3,34 µCi/8 mg) und 32 mg Salicylsäure-Addukt (≙ 8 mg Salicylsäure, Aktivität 3,558 µCi/32 mg Addukt). In zunächst sehr kurzen (20 Minuten) dann länger werdenden Abständen (30 Minuten, 60 Minuten) wurden aus dem retroorbitalen Venenplexus Blutproben entnommen, deren Radioaktivität nach entsprechender Aufbereitung im Flüssig-Scintillationszähler gemessen wurde.

Die in den Tabellen 2 und 3 und in Abb.9 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß ein unterschiedliches Resorptionsverhalten der Salicylsäure in beiden Versuchsreihen zu beobachten ist.

Zeit [h/min]	Aktivität $\cdot 10^{-2}$ [µCi/g Blut]	Salicylsäure-Blutspiegel $\cdot 10^{-2}$		
		mg/g Blut ($\bar{x}$)	Standard-abweichung (s)	Standard-fehler ($s_{\bar{x}}$)
0.20	1,274	10,16	2,48	0,83
0.40	1,340	10,72	1,52	0,62
1.00	1,422	11,37	1,56	0,55
1.20	1,460	11,68	2,48	0,94
1.40	1,485	11,84	1,84	0,65
2.00	1,462	11,68	2,72	1,03
2.30	1,506	12,00	2,40	0,80
3.00	1,511	12,09	2,00	0,71
3.30	1,463	11,68	1,92	0,68
4.00	1,412	11,28	1,44	0,59
4.30	1,395	11,16	1,92	0,73
5.00	1,344	10,72	1,84	0,65
6.00	1,247	9,98	1,68	0,64
7.00	1,201	9,60	1,76	0,67
8.00	1,112	8,88	1,68	0,56
10.00	1,014	8,11	1,20	0,42
24.00	0,237	1,92	1,04	0,35

Tabelle 2: Blutspiegelwerte nach ^{14}C-Salicylsäure-Applikation bei 9 Ratten. Die der Berechnung zugrunde gelegte Dosis wurde auf 1 µCi für 100g schwere Ratten normiert.

Zeit [h / min]	Aktivität $\cdot 10^{-2}$ [µ Ci/g Blut]	Salicylsäure-Blutspiegel $\cdot 10^{-2}$		
		mg/g Blut ($\bar{x}$)	Standard-abweichung (s)	Standard-fehler ($s_{\bar{x}}$)
0.20	0,495	3,96	1,76	0,62
0.40	0,573	4,58	2,16	0,82
1.00	0,672	5,38	1,84	0,65
1.20	0,618	4,96	1,20	0,42
1.40	0,661	5,23	1,60	0,57
2.00	0,751	6,00	1,68	0,69
2.30	0,875	7,00	2,00	0,82
3.00	0,873	6,98	1,76	0,79
3.30	0,954	7,63	0,96	0,34
4.00	1,036	8,32	3,60	1,27
4.30	1,082	8,66	3,20	1,31
5.00	1,109	8,88	3,60	1,36
6.00	1,082	8,64	3,12	1,10
7.00	1,083	8,66	1,52	0,62
8.00	1,062	8,50	1,44	0,72
10.00	0,992	7,94	1,76	0,79
24.00	0,743	5,92	1,92	0,86

Tabelle 3: Blutspiegelwerte nach ^{14}C-Salicylsäure-Choleinsäure-Applikation bei 8 Ratten. Die der Berechnung zugrunde gelegte Dosis wurde auf 1 µCi für 100g schwere Ratten normiert.

Der Salicylsäureblutspiegel steigt nach der Applikation der freien Salicylsäure schnell bis zum Maximum an, und sinkt dann schwach exponentiell (Reaktion

1. Ordnung) ab. Beim Betrachten der Blutspiegelkurve nach der Applikation der Einschlußverbindung erkennt man einen langsameren Anstieg mit einer zeitlichen Verschiebung des Maximums um etwa 3 Stunden. Auch werden nicht die gleich hohen Blutspiegelwerte erreicht, wie nach der Applikation der freien Salicylsäure. Dafür ist die Breite des Maximums ausgeprägter. Die Blutspiegelwerte fallen anschließend langsam ab.

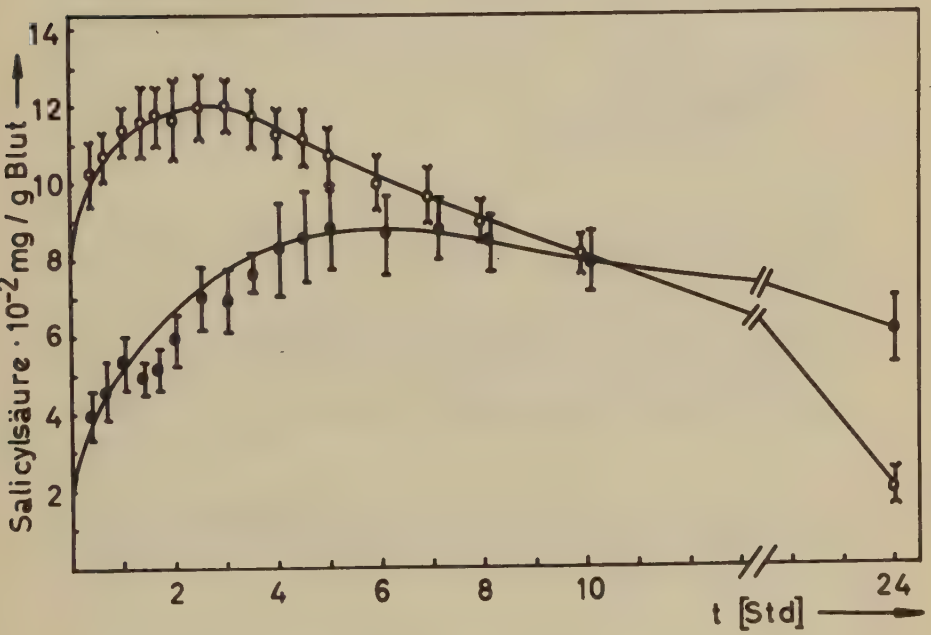


Abb. 9: Salicylsäure-Blutspiegel bei Ratten nach Verabreichung von 8 mg Salicylsäure bzw. von 32 mg Salicylsäure-Choleinsäure (≙ 8 mg Salicylsäure) pro Tier

$s_{\bar{x}}$ der freien Salicylsäure

$s_{\bar{x}}$ der Salicylsäure-Choleinsäure

Damit können die anfangs erwähnten Fragen hinsichtlich der Löslichkeit der Choleinsäuren im Darmbereich positiv beantwortet werden. Die zeitliche Verschiebung des Maximums nach Applikation der Choleinsäure kann auf das Vorliegen einer Magensaftresistenz zurückgeführt werden, wodurch im Magen keine Resorption erfolgt. Erst nach dem Übertritt in den Darm beginnt die Freisetzung der Salicylsäure aus dem Addukt.

2.2.1 Statistische Auswertung des Tierversuches

2.2.1.1 Standardabweichung s und Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$

Die für jede Zeiteinheit anfallenden Werte (N) innerhalb der beiden Versuchsreihen galt es zu ordnen. Zugrunde gelegt wurde eine Normal-Verteilung, deren Mittelwert durch das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) und deren Streuung durch die Standardabweichung (s) berechnet wird.

$$\bar{X} = \frac{\Sigma X_i}{N} \qquad \Delta = \sqrt{\frac{\Sigma (X_i - X_2)^2}{N-1}}$$

Um Aussagen über die Genauigkeit des Mittelwertes ($\bar{x}$) zu machen, dient die Berechnung der Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$). Dieser Wert wird auch als die Standardabweichung in der Verteilung von Mittelwerten, die aus zahlreichen Stichproben vom Umfang N aus derselben Grundgesamtheit gewonnen werden kann, bezeichnet.

Die Zuverlässigkeit des Mittelwertes steigt mit der Quadratwurzel der Anzahl der beobachteten Fälle.

$$\Delta_{\bar{X}} = \frac{1}{\sqrt{N}} \cdot \Delta$$

2.2.1.2 Signifikanzprüfung der Mittelwerte beider Kurven

Werden bei vergleichenden Untersuchungen wie im vorliegenden Fall bei Resorptionsversuchen der Salicylsäure und seines Desoxycholsäure-Adduktes Differenzen gefunden, muß der Frage nachgegangen werden, ob die beobachteten Unterschiede nur zufallsbedingt sind (methodische Fehler, Schwankungen im Tiermaterial usw.) oder bestimmten Gesetzmäßigkeiten folgen.

Diese Prüfung auf Nichtzufälligkeit oder Signifikanz, d. h. der Beweis von vorhandenen Unterschieden, wird durch den t-Test nach Student geführt. Die Signifikanz zweier Mittelwerte wird in p, gleich sog. Wahrscheinlichkeitsgraden, ausgedrückt. Ist p = 0, kann mit absoluter Sicherheit die Differenz als gesichert gelten. Geht der Wert p gegen 1,0 , wird die Aussage immer ungewisser. So ist bei p = 0,5 die Wahrscheinlichkeit, daß das Resultat zufallsbedingt ist, schon 50%. Als Kriterium gilt der Wert p = 0,05 , der die bestehende Differenz mit 95%iger Wahrscheinlichkeit sichert.

Für t gilt die folgende Formel

$$t = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) \cdot \sqrt{\frac{(N_1+N_2-2)}{N_1+N_2} \cdot \frac{N_1 \cdot N_2}{\Delta_1^2 (N_1-1) + \Delta_2^2 (N_2-1)}}$$

N_1 , $\bar{x}_1$, s_1^2 = Umfang bzw. Mittelwert bzw. Varianz der Salicylsäure-Reihe

N_2 , $\bar{x}_2$, s_2^2 = Umfang bzw. Mittelwert bzw. Varianz der Salicylsäure-Adduktreihe.

Der Wert für p wird aus der t-Verteilungstabelle entnommen. Die Zahl der Freiheitsgrade n ist beim Vergleich zweier Werte vom Umfang N_1 und N_2 gleich: $n = N_1 + N_2 - 2$

Zeit [h/min]	t-Wert	Freiheits-grad n	p-Wert
0.20	5,82	15	0,001 > p
0.40	5,71	11	0,001 > p
1.00	7,04	14	0,001 > p
1.20	6,80	13	0,001 > p
1.40	7,40	14	0,001 > p
2.00	4,37	11	0,01 > p > 0,001
2.30	4,28	13	0,001 > p
3.00	4,65	11	0,001 > p
3.30	3,44	14	0,01 > p > 0,001
4.00	3,44	12	0,01 > p > 0,001
4.30	1,76	11	0,20 > p > 0,10
5.00	1,30	13	0,30 > p > 0,20
6.00	0,99	13	0,40 > p > 0,30
7.00	1,02	11	0,40 > p > 0,30
8.00	0,41	11	0,70 > p > 0,60
10.00	0,21	11	0,90 > p > 0,80
24.00	5,15	12	0,001 > p

Tabelle 4: Signifikanzprüfung im t-Test nach Student

Wie aus den p-Werten der Tabelle 4 zu entnehmen ist, besteht zwischen beiden Blutspiegelkurven nach Einnahme von Salicylsäure und vom Salicylsäure-Addukt im Zeitraum vom Beginn des Versuches an bis zur 4. Stunde

ein signifikanter Unterschied. In der sich anschließenden Zeit nähern sich die Werte, da die Kurven sich kreuzen. Der Salicylsäure-Blutspiegel aus der Salicylsäure sinkt entsprechend seiner Elimination, während der Salicylsäure-Spiegel aus dem Addukt ein breiteres Maximum besitzt und sehr viel langsamer abfällt. Bereits nach 24 Stunden ist die beobachtete Differenz wieder signifikant.

3. Exkretionsuntersuchungen beim Menschen

Die im Tierversuch an Ratten gewonnenen Erkenntnisse über die Resorption der Salicylsäure, bzw. der Salicylsäure-Choleinsäure, sollten nun auf ihre Gültigkeit auch beim Menschen untersucht werden. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob aus dem Salicylsäure-Addukt auch hier, bedingt durch seine Säureresistenz, die Gastkomponente verzögert freigegeben wird und so gegenüber der Applikation freier nicht eingeschlossener Salicylsäure verspätet zur Resorption gelangt. Ein weiterer wichtiger Punkt war die Erstellung einer Gesamtbilanz der mit dem Harn ausgeschiedenen Salicylsäuremengen.

An den Versuchen waren 10 Probanden (6 Männer, 4 Frauen) beteiligt, die jeweils entsprechende Dosen freier Salicylsäure und nach einigen Tagen Salicylsäure-Choleinsäure einnahmen.

Die Bestimmung der Gesamtsalicylate im Harn erfolgte nach L e v y (50). Mit dieser Methode werden die freie Salicylsäure, die Salicylursäure und die Glukuronide der Salicylsäure erfaßt.
Die Ergebnisse sind in Tab. 5 und 6 und in Abb. 10, 11 und 12 aufgeführt.

In der Salicylsäure-Serie fand sich die stärkste Ausscheidung mit durchschnittlich 14,8% der Dosis in der 2. Stunde. Individuell lag die Maximalausscheidung pro Fraktion mit Werten von 10,6% bis 25,1% der Dosis 1 mal bei der Fraktion 0 - 1 Stunde, 5 mal bei 1 - 2 Stunden, 1 mal bei 2 - 3 Stunden und 3 mal bei 3 - 4 Stunden.
Insgesamt wurden innerhalb von 14 Stunden im Mittel 93,2% der Dosis renal eliminiert.

Person	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$	s
Dosis [mg]	100	100	250	250	500	500	250	250	250	250		
Zeit [Std]												
0-1	13,5	25,1	11,2	11,8	7,1	7,0	8,9	5,0	10,7	2,8	10,3	6,1
1-2	22,9	19,0	12,9	16,4	11,4	16,7	14,1	9,5	15,1	9,7	14,8	4,2
2-3	18,7	19,0	15,2	15,8	12,4	3,4	13,7	12,4	11,1	8,8	13,1	4,6
3-4	11,7	10,2	9,9	13,4	12,5	8,9	11,3	12,8	11,2	10,6	11,3	1,4
4-5	9,1	7,9	11,5	10,5	10,6	8,4	12,0	10,2	10,4	8,0	9,9	1,4
5-6	6,8	4,0	8,8	9,0	10,4	7,4	9,4	10,7	7,8	8,5	8,3	1,9
6-7	5,9	8,2	9,6	6,6	9,3	6,7	7,5	7,6	6,3	6,4	7,4	1,3
7-8	4,8	2,4	10,1	4,1	7,3	6,4	6,2	5,9	5,5	5,4	5,8	2,0
8-10	5,0	0,7	-	4,8	9,0	9,6	8,4	8,0	7,6	10,5	7,1	3,0
10-12	3,3	1,3	-	1,9	4,8	8,2	1,6	4,3	3,8	7,4	4,1	2,4
12-14	1,9	-	-	0,9	2,4	6,5	2,0	1,9	1,9	3,5	2,6	1,7
Gesamtmenge	103,6	97,8	89,2	95,2	97,2	89,2	99,1	88,5	91,4	81,6	93,2	6,9

Tabelle 5: Ausscheidung von Gesamtsalicylat nach oraler Gabe von Salicylsäure beim Menschen. [%] der applizierten Dosis.

Person	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	x	s
Dosis [g]	0,392	0,392	0,98	0,98	1,96	1,96	0,98	0,98	0,98	0,98		
Zeit [Std]												
0-1	2,8	2,3	4,4	0,7	0,8	0,0	2,7	1,4	2,3	0,8	1,8	1,3
1-2	5,8	10,7	11,3	4,6	2,3	1,7	6,4	6,6	6,0	2,0	5,7	3,3
2-3	7,4	3,7	14,1	12,0	3,4	3,6	9,8	7,5	6,9	7,2	7,6	3,6
3-4	8,8	11,3	10,0	11,5	7,1	4,2	12,2	8,5	6,4	7,1	8,7	2,6
4-5	10,0	11,1	10,0	10,4	9,1	5,7	12,3	9,3	6,3	7,9	9,2	2,0
5-6	7,7	6,4	8,8	8,0	9,9	5,3	9,5	10,3	5,7	6,9	7,8	1,7
6-7	5,2	4,1	8,2	6,0	9,1	6,4	8,6	8,2	5,2	6,3	6,7	1,7
7-8	3,3	3,5	7,4	4,0	7,6	4,9	7,7	6,3	3,9	5,8	5,4	1,7
8-9	2,9	3,0	4,9	3,0	6,7	5,2	3,5	4,7	3,4	6,0	4,3	1,4
9-11	5,2	3,5	2,7	4,5	10,0	9,0	9,6	7,2	3,1	8,8	6,4	2,9
11-13	3,3	3,5	1,3	2,4	6,0	6,9	4,3	4,7	4,0	6,4	4,3	1,8
13-15	1,4	0,6	-	1,3	3,0	5,6	1,9	2,8	2,2	5,6	2,6	1,6
15-24	4,5	0,3	-	3,2	3,5	10,0	5,7	6,8	5,4	4,1	4,8	2,6
Gesamt-menge	67,3	74,0	83,3	71,6	78,7	68,5	94,2	84,3	60,9	74,9	74,9	9,8

Tabelle 6: Ausscheidung von Gesamtsalicylat nach oraler Gabe von Salicylsäure-Choleinsäure beim Menschen. [%] der applizierten Dosis

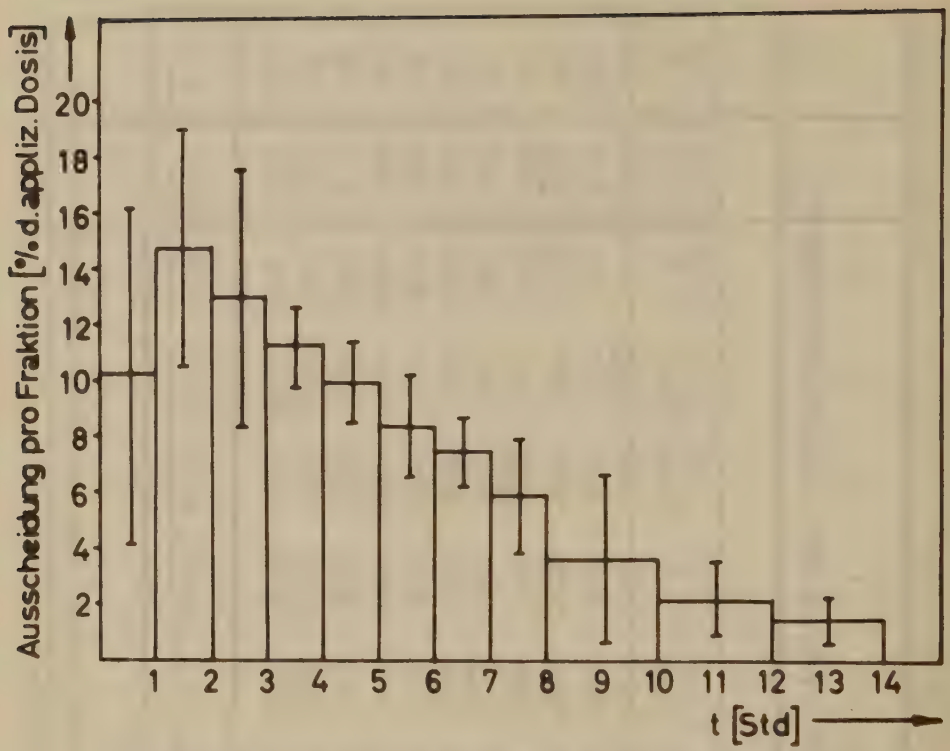


Abb. 10: Renale Ausscheidung von Gesamtsalicylat nach oraler Gabe von Salicylsäure beim Menschen. (Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichung s von 10 Versuchspersonen)

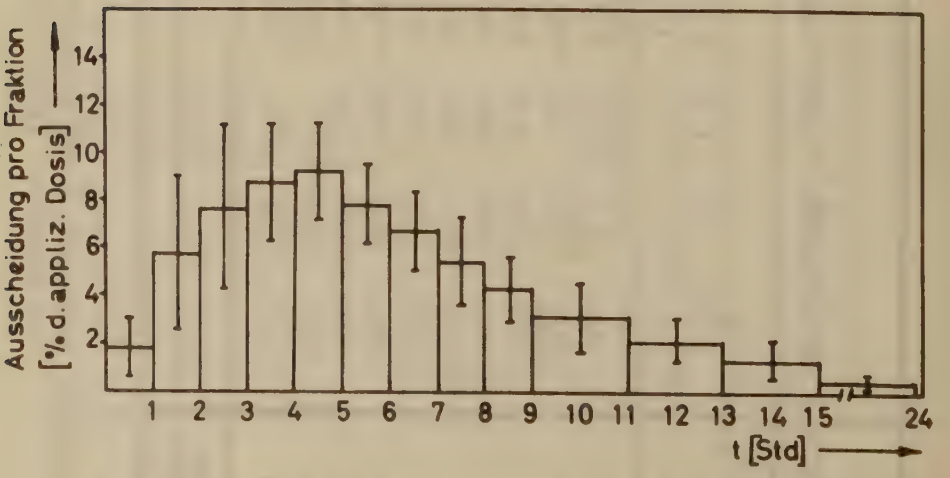


Abb. 11: Renale Ausscheidung von Gesamtsalicylat nach oraler Gabe von Salicylsäure-Choleinsäure beim Menschen. (Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabwei-

In der Salicylsäure-Choleinsäure-Serie wurde die größte Menge Gesamtsalicylsäure von durchschnittlich 9,2% der Dosis in der 5. Stunde ausgeschieden. In der Maximalausscheidung traten individuelle Schwankungen pro Fraktion mit Werten von 6,4% bis 14,1% der Dosis auf, und zwar 3 mal bei der Fraktion 2 - 3 Stunden, 6 mal bei 3 - 6 Stunden und 1 mal bei 6 - 7 Stunden. Obwohl die renale Elimination über 48 Stunden verfolgt wurde, konnte über die Zeit von 24 Stunden hinaus nur noch bei 3 Probanden eine gewisse Salicylsäure-Ausscheidung von maximal 1% der Dosis festgestellt werden. Die nach 24 Stunden im Mittel im Harn gefundene Substanzmenge betrug 74,9% der Dosis.

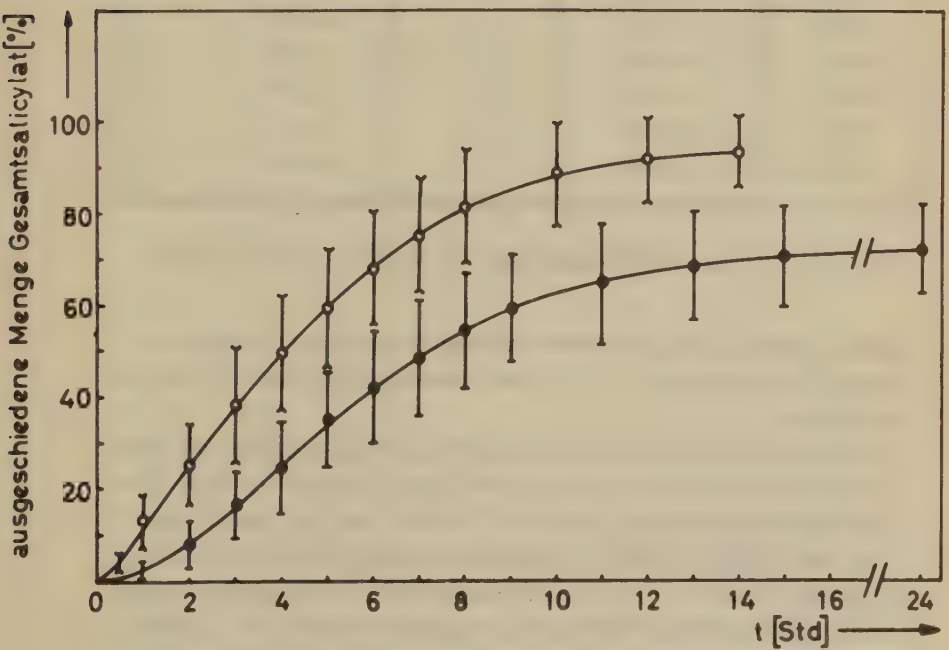


Abb. 12: Kumulative Ausscheidung von Gesamtsalicylat im Harn beim Menschen. (Mittelwerte $\bar{x}$ und Standardabweichung s von 10 Versuchspersonen)

nach Gabe der freien Salicylsäure

nach Gabe der Salicylsäure-Choleinsäure

Abb. 12 zeigt deutlich die unterschiedliche Gesamtsalicylatausscheidung beider Serien. Zur Prüfung der Signifikanz des unterschiedlichen Kurvenverlaufes wurde wie in Abschnitt 2.2.1.2 eine statistische Auswertung vorgenommen. (s. Tab. 7)

Zeit [h/min]	t-Wert	Freiheitsgrad n	p-Wert
1,00	4,25	18	0,001 p
2.00	5,17	18	0,001 p
3.00	4,66	18	0,001 p
4.00	4,79	18	0,001 p
5.00	4,12	18	0,001 p
6.00	4,79	18	0,001 p
7.00	4,84	18	0,001 p
8.00	4,90	18	0,001 p

Tabelle 7: Signifikanzprüfung im t-Test nach Student

Diese ergab, daß zwischen beiden Kurven ein signifikanter Unterschied von hoher Wahrscheinlichkeit (99,9%) besteht.

Die mit dem Salicylsäure-Addukt durchgeführten Selbstversuche zeigten einen um etwa eine Stunde verzögerten Ausscheidungsbeginn. Die Hälfte der Salicylsäure war bei dem Addukt nach 7 Stunden ausgeschieden, was eine Verschiebung von 3 Stunden gegenüber der Ausscheidung nach Applikation freier Salicylsäure bedeutet. Insgesamt wurden knapp 75% der im Addukt verabreichten Salicylsäure gegenüber 93% nach Applikation der freien Salicylsäure wiedergefunden. Es muß angenommen werden,

daß ein Teil der Salicylsäure nicht zur Resorption gelangte. Ursache dafür könnte ein nicht quantitatives Freisetzen der Salicylsäure aus dem Addukt sein, oder der durch die Desoxycholsäure in diesen hohen Konzentrationen bewirkte Flüssigkeitsstrom in das Darmlumen (51, 52), was zu einer leichten Diarrhoe bei einigen Probanden führte. In diesem Fall wäre die Ausscheidung eines Teiles der noch nicht zersetzten Choleinsäure mit dem Kot denkbar.
Dieses Problem ist in weiteren Untersuchungen zu klären.

4. Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit der Frage der pharmazeutischen Verwendung von Einschlußverbindungen der Desoxycholsäure mit der Linolsäure, dem Vitamin K_3 und der Salicylsäure befaßt. Die Anregungen für diese Problemstellung gaben Untersuchungen über die Stabilität von Harnstoff-Addukten und deren Verarbeitung in Tabletten, die in unserem Arbeitskreis von F r ö m m i n g (8,9) durchgeführt wurden. Weitere Berichte in der Literatur über pharmazeutisch interessierende Choleinsäuren (16,27,34,36,39), bezogen sich zumeist auf das Addukt allein, ohne die Fragen der Verarbeitung in festen Arzneiformen, z. B. in Tabletten, anzusprechen. Diesen in der pharmazeutischen Praxis aber immer wieder auftauchenden Problemen des Verhältnisses Wirkstoff-Hilfsstoff sind ein Teil meiner Untersuchungen gewidmet. Ist der Schutz oxydationsempfindlicher Substanzen, die als Addukte stabilisiert sind, auch in inniger Mischung mit pharmazeutischen Hilfsstoffen gewährleistet? In welchem Maße übt der Kompressionsdruck auf die Stabilität der Einschlußverbindungen einen negativen Einfluß aus? Werden z. B. flüssige Substanzen, die als Choleinsäure in fester Form vorliegen, durch den Druck wieder aus dem Addukt freigesetzt?

Ich verwendete zur Beantwortung der Stabilitätsfragen die Linolsäure als Modellsubstanz für andere pharmazeutisch interessierende oxydationsempfindliche Substanzen. Dabei konnte ich zeigen, daß äußere Einflüsse wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Kompressionsdruck auf die Linolsäure-Choleinsäure allein unkritisch waren. Die Mischung mit einigen ausgewählten Hilfsstoffen, wie Kartoffelstärke, Laktose, Cellulose und Talcum siliconisatum, als auch die Granulierung von Addukt-Hilfs-

stoffmischungen mit wässrigen Bindemittellösungen der Gelatine, des Arabischen Gummi,der Stärke und des Aerosil comp., hatten keinen negativen Einfluß auf die Haltbarkeit. Die ebenfalls durchgeführten Komprimierungsversuche dieser komplexen Gemische, zeigten keine Schädigung des Adduktes. Die Linolsäure ist unter den von mir gewählten Bedingungen in ihrem Addukt stabil. Dies ließ sich mittels der Peroxidzahlbestimmung und des manometrischen Sauerstoffverbrauchs zeigen.

Für die pharmazeutische Verwendung von Einschlußverbindungen läßt sich daraus ableiten, daß bei der Verarbeitung von oxydations-, licht- und luftempfindlichen Wirkstoffen ein sicherer Schutz in Form ihrer Addukte möglich ist. Dieser Gesichtspunkt erlangt um so mehr Bedeutung, als die modernen Wirkstoffe vielfach in komplizierte Stoffwechselvorgänge eingreifen sollen und deshalb oft schon von Natur aus außerordentlich reaktionsfreudig sind.

Eine weitere wichtige Frage ist die Freigabe des im Addukt eingeschlossenen Gastmoleküls unter physiologischen Bedingungen. Die hier zunächst durchgeführten in vitro Versuche mit der Salicylsäure- und Menadion-Choleinsäure zeigten überraschenderweise eine ausgezeichnete Säurestabilität. Die Löslichkeit im künstlichen Magensaft und auch bei pH 4,5 liegt unter 1%. Erst beim Übergang ins Neutrale bis schwach Alkalische kommt es zur Freisetzung des eingeschlossenen Moleküls.

Diese Untersuchungen zeigen, daß durch die Anwendung von Choleinsäuren eine neue Möglichkeit zur Herstellung magensaftresistenter Arzneiformen gefunden wurde. Die bei solchen Arzneiformen oft festgestellte verzögerte Wirkstofffreigabe konnte ebenfalls durch den "Half Change-Test" gezeigt werden.

Zur Nachprüfung dieser Ergebnisse in vivo wurden von mir Resorptionsversuche mit ^{14}C-markierter Salicylsäure und dem entsprechenden Addukt mit Ratten durchgeführt. Sie sollten die Fragen der Freisetzung der Gastkomponente aus dem Addukt, die in vitro festgestellte Magensaftresistenz und die dadurch verzögerte Liberation beantworten.
Das Ergebnis zeigt, daß gegenüber dem ungebundenen Arzneistoff die Arzneistoff-Choleinsäure eine magensaftresistente Arzneiform darstellt, die außerdem eine verzögerte Wirkstofffreigabe zeigt.
Schließlich wurde in Selbstversuchen das Verhalten der Salicylsäure-Choleinsäure im Vergleich zur Salicylsäure beim Menschen untersucht. Als Kriterium zog ich im Rahmen meiner Arbeit die Exkretion der Salicylsäure und ihrer Metaboliten im Harn heran.
Die schon im Tierversuch gewonnene Erkenntnis der zeitlich verzögerten Resorption, bedingt durch die Magensaftresistenz der Choleinsäuren, konnte auf Grund eines verzögerten Ausscheidungsbeginns der Salicylsäure, nach Einnahme der Choleinsäure, bestätigt werden. Die Alkalität des menschlichen Darmsaftes reicht also zur Liberation des Wirkstoffes aus seinem Addukt und ermöglicht so die anschließende Resorption.
Die Exkretion der freien Salicylsäure durch den Harn beträgt bei meinen Versuchen durchschnittlich 93,2%. Für die Salicylsäure-Choleinsäure wurden 74,9% gefunden. Es muß angenommen werden, daß der fehlende Betrag nicht zur Resorption gelangte und mit dem Stuhl ausgeschieden wurde oder eine ungenügende Freisetzung der Salicylsäure aus der Choleinsäure erfolgte.

Die in der Literatur gemachten Angaben über die resorptionshemmende Wirkung von Gallensäuren (51) und deren Salze (52) auf Grund einer größeren Flüssigkeits-

sekretion in den Magen-Darm-Kanal müssen hier ebenfalls beachtet werden, zumal bei einem Drittel der Probanden eine leichte Diarrhoe festzustellen war.

Zu diskutieren wäre hier aber auch, ob eine Resorptionserhöhung durch eine Vergrößerung der Oberfläche der Choleinsäuren erreicht werden kann.

1. Darstellung der Einschlußverbindungen

1.1 Linolsäure-Choleinsäure

In Anlehnung an die Arbeitsweise von W i e l a n d und S o r g e (10) werden

4,9g Linolsäure und
54,8g Desoxycholsäure

in 200 ml Methanol unter Rückfluß gelöst.
Aus dem Kolben und Kühler wird mit Stickstoff die Luft vertrieben, um einer Oxydation der Linolsäure vorzubeugen. Durch langsames Abkühlen auf 20° gewinnt man die 1. Kristallfraktion. Nach Abtrennung der Mutterlauge wird aus dieser bei 0 bis -5° eine 2. Fraktion gewonnen. Durch Umkristallisation aus wenig heißem absoluten Methanol erfolgt die Reinigung. Die Kristalle werden scharf abgesaugt und mit wenig Petroläther nachgewaschen. Farblose nadelförmige Prismen.
Ausbeute: 61,2%
Schmelzpunkt: 177° unkorrigiert
Gehalt: 9,9% Linolsäure , bestimmt nach der Xylolmethode(10)
Molverhältnis: Desoxycholsäure : Linolsäure = 8 : 1

1.2 Menadion-Choleinsäure

Nach der Arbeitsweise von C i l e n t o (39) werden

1,0g Menadion (2-Methyl-naphthochinon-1,4) und
8,0g Desoxycholsäure

in 30 ml Methanol unter Rückfluß gelöst.
Beim Abkühlen scheiden sich gelbe Kristallnadeln aus. Diese werden scharf abgesaugt und mit Hexan gewaschen, um anhaftendes ungebundenes Menadion zu entfernen.
Ausbeute: 65,0%
Schmelzpunkt: 172° unkorrigiert

Gehalt: 16,5% Menadion (spektralphotometrisch in Äthanol bei 333 nm)
Molverhältnis: Desoxycholsäure : Menadion = 2 : 1

1.3 Salicylsäure-Choleinsäure

In Anlehnung an die Arbeitsweise von W i e l a n d und S o r g e (10) werden

28,0g Desoxycholsäure (15% Überschuß) in 100 ml Methanol heiß gelöst und

8,0g Salicylsäure hinzugegeben.

Beim Abkühlen scheiden sich weiße Kristalle aus. Diese werden mit 70%igem Methanol scharf abgesaugt.
Ausbeute: 65,6%
Schmelzpunkt: 196° unkorrigiert
Gehalt: 25 - 26% (spektralphotometrisch in Äthanol bei 305 nm)
Molverhältnis: Desoxycholsäure : Salicylsäure = 1 : 1

2. Analytische Methoden

2.1 Lagerungsversuche bei verschiedenen relativen Feuchten

Die Substanzen wurden bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchtigkeiten in Exsikkatoren von 20 cm Durchmesser in einem temperaturkonstanten Raum ($20^{\circ} \pm 1{,}0^{\circ}$) gelagert. Als Hygrostatenfüllungen wurden die folgenden Lösungen verwendet (41).

Lösung	Konzentration	rel. Feuchte %
H_2SO_4	62,4%	12,3
H_2SO_4	56,7%	21,1
$MgCl_2$	gesättigt	33,6
KSCN	ges.	47,1
$Na_2Cr_2O_7$	ges.	55,2
$CuCl_2$	ges.	68,0
$(NH_4)_2\ SO_4$	ges.	80,6
C_6H_5COONa	ges.	88,0
K_2SO_4	ges.	97,2
H_2O	ges.	100

Die Proben befanden sich in flachen Wägegläschen. Die Einwaagen lagen bei etwa 1g. Die Gewichtszunahme der Proben wurde durch wöchentliche Kontrollwägungen verfolgt; bei längeren Lagerzeiten erfolgten die Wägungen in monatlichen Abständen. Parallel zu diesen Bestimmungen wurden Proben der Linolsäure-Choleinsäure, die sich im gleichen Exsikkator befanden, zur Peroxidzahlbestimmung entnommen.

2.2 Bestimmung der Peroxidzahl

Die Bestimmung der Peroxidzahl wurde nach dem Deutschen Arzneibuch, 7. Ausgabe 1968, Ziffer 68, durchgeführt. Es wurden Einwaagen von 0,5g bis 1,0g Linolsäure-Choleinsäure verwendet. Zur Bestimmung in Tabletten wurden Einwaagen von 5g bis 10g gepulvert, im Soxhlet 3 Std.

mit Chloroform extrahiert, das Lösungsmittel auf 10 ml eingeengt. Nach Zugabe von 10 ml Eisessig wurde die Peroxidzahl wie üblich bestimmt.

2.3 Manometrische Untersuchungen

Die manometrischen Messungen erfolgten nach der Warburg-Methodik. Die Stabilität von Choleinsäuren in Abhängigkeit vom Feuchtigkeitsgehalt der Hilfsstoffe wurde untersucht:

a) nach einfacher Mischung der Bestandteile
b) nach Mischung der Bestandteile, Komprimierung in der Tablettenmaschine EK 0 der Firma K o r s c h und Zerkleinerung mit Mörser und Pistill.

Es wurden folgende Ansätze hergestellt

1. 2 Gefäße mit je 40 mg Linolsäure-Choleinsäure und 360 mg Hilfsstoff
2. 2 Gefäße mit je 40 mg Linolsäure-Choleinsäure
3. 2 Gefäße mit je 360 mg Hilfsstoff

Hilfsstoffe: Stärke, Laktose, Granulatum simplex ad tablettas-Pharmakopoea Danica 1948 III, mikrokristalline Zellulose

Bei Verwendung von Talcum siliconisatum hatte der Ansatz folgende Zusammensetzung:

1. 2 Gefäße mit je 40 mg Linolsäure-Choleinsäure und 20 mg Talcum siliconisatum
2. 2 Gefäße mit je 40 mg Linolsäure-Choleinsäure
3. 2 Gefäße mit je 20 mg Talcum siliconisatum

Der Sauerstoffverbrauch unter 2. und 3. aufgeführten Gefäße wurde jeweils zur Korrektur von 1. berücksichtigt. Bei allen Meßreihen liefen zur Bestimmung von Blindwerten jeweils 2 Gefäße ohne Substanzeinwaage mit. Die Volumina der Linolsäure-Choleinsäure, der Hilfsstoffe

und der Mischungen beider, die zur Berechnung der Gefäßkonstanten benötigt wurden, konnten aus zylindrischen Preßlingen ermittelt werden, die mit einer KBr-Presse mit einem Druck von 300 kg/cm^2 hergestellt wurden. Hierbei wurden folgende Werte erhalten:

Linolsäure-Choleinsäure 40 mg	= 37,9 µl
Stärke 360 mg + 40 mg Choleinsäure	= 294,7 µl
Stärke 360 mg	= 260,9 µl
Laktose 360 mg + 40 mg Choleinsäure	= 285,6 µl
Laktose 360 mg	= 245,2 µl
Granulatum simplex 360 mg + 40 mg Choleinsäure	= 289,2 µl
Granulatum simplex 360 mg	= 259,2 µl
Mikrokristalline Zellulose 360 mg + 40 mg Choleinsäure	= 279,9 µl
Mikrokristalline Zellulose 360 mg	= 243,9 µl
Talcum siliconisatum 20 mg + 40 mg Choleinsäure	= 47,4 µl
Talcum siliconisatum 20 mg	= 8,4 µl

Die Temperatur betrug 37°. Zum Temperaturausgleich wurde 5 Minuten mit offenem Hahn geschüttelt. Die Schüttelfrequenz betrug 100 Schwingungen pro Minute. Es wurde zunächst stündlich, nach einem Tag zweistündlich, darauf bis zum Ende fünf- bis zwölfstündlich abgelesen.

2.4 Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes der Hilfsstoffe

Die Bestimmung erfolgte mit der IR-Prozentwaage "Inframatic" der Firma S a u t e r.

2.5 Aufnahme der IR-Spektren

Die Substanzen wurden im Achatmörser mit Polytrifluormonochloräthylen (Voltalef 3S, Typ Nr. 33620/2, Firma L e h m a n n & V o s s & C o, Hamburg) gründlich verrieben und zwischen NaCl-Platten vermessen.
Schichtdicke: kapillar, d. h. in einer Filmschicht von 0,01 bis 0,001 mm
Dehnung der Ordinate: 2,375 fach
Gerät: IR-Spektrophotometer 421 der Firma B o d e n s e e w e r k P e r k i n - E l m e r.

3. Komprimierungsversuche

a) Zur Belastung bis 300 kg/cm^2 wurden die Pulver bzw. Pulvermischungen 5 Minuten in der KBr-Presse für die IR-Spektroskopie (Fa. Wiko) unter Vacuum komprimiert.

b) Tablettierung nach Feuchtgranulierung

Einschlußverbindung	10,0g
Stärke	56,0g
Laktose	24,0g

wurden gemischt, durch Sieb V gegeben, mit der Granulationsflüssigkeit befeuchtet und durch Sieb IV von Hand granuliert.

Granulationsflüssigkeiten:

10%ige wässrige Gelatinelösung,
10%ige Gummi arabicum-Lösung,
10%iger Stärkekleister
10%ige Aerosil compositum^R-Anreibung.

Nach 14-stündigem Trocknen an der Luft bei Raumtemperatur wurde durch Sieb IV desaggregiert und Gleit- und Sprengmittel (Stärke 5,0g/ Talcum siliconisatum 5,0g) durch Sieb V darüber gestäubt und gemischt. Die Komprimierung erfolgte mit einer Korsch-Tablettenmaschine, Typ EK 0. Die Bestimmung der Härte der Tabletten wurde mit dem Erweka-Härtetester durchgeführt. Die Prüfung der Tablettenzerfallszeit erfolgte nach dem Deutschen Arzneibuch, 7. Ausgabe 1968, Ziffer 87.

4. Löslichkeitsversuche

4.1 Dissolution Test nach L e v y (45)

In 600 ml Bechergläsern wird mit 350 ml Untersuchungslösung gearbeitet. Diese bestanden aus

a) pH 1,0 0,1 N Salzsäure
b) pH 4,5 Azetatpuffer (47)
c) pH 7,5 Phosphatpuffer (47)
d) pH 8,5 Britton-Robinson-Puffer I (47)

Es wurde mit einem dreiflügeligen Propellerrührer, mit einer Rührgeschwindigkeit von 60 U/Min. gerührt. Temperatur 37°. Zum Zeitpunkt 0 wurden die abgewogenen Substanzen in die Untersuchungslösung gegeben. Mit einer 5 ml-Pipette, der eine Glasfritte vorgesetzt war, wurden zu den gewünschten Zeiten die Proben entnommen. Zur Bestimmung der Salicylsäure wird die entnommene Probemenge mit 0,1 N Salzsäure auf 50,0 ml aufgefüllt und direkt spektralphotometrisch bei 303 nm bestimmt.

Die Gehaltsbestimmung von Menadion erfordert nach der Probenahme ein Ansäuern mit 25 ml 0,1 N Salzsäure und eine zusätzliches Ausschütteln mit 5 x 8 ml Chloroform. Die gesammelten Extrakte werden auf 50 ml mit Chloroform aufgefüllt und nach dem Trocknen mit Natriumsulfat sicc. spektralphotometrisch bei 335 nm gemessen.

Die bei Verwendung von alkalischen Puffern nach dem Ansäuern ausgefallene Desoxycholsäure wird vor der Messung abfiltriert.

4.2 Half Change-Methode nach M ü n z e l (46)

Unter Berücksichtigung der Modifizierung von R i t s c h e l und O r t h (48) werden in ein 600 ml Becherglas 350 ml Untersuchungslösung I gegeben.

Lösung I :Salzsäure-Natriumchlorid-Lösung pH 1,2 (49)

Lösung II:Phosphatpuffer pH 7,5 (49)

Rührgeschwindigkeit 60 U/Min., Temperatur 37°. Die Untersuchungssubstanz wird zum Zeitpunkt 0 in die

Lösung I gegeben. In stündlichen Abständen werden 175 ml Probelösung durch eine Glasfritte abgesaugt und die Untersuchungslösung durch 175 ml der Lösung II zu 350 ml aufgefüllt. In den stündlich entnommenen Probelösungen wird die Gehaltsbestimmung wie beim Dissolution Test nach L e v y (siehe Abschnitt 4.1) durchgeführt und die pH-Messung mit der Glaselektrode vorgenommen.

5. Resorptionsversuche mit ^{14}C-markierter Salicylsäure

5.1 Darstellung der ^{14}C-Salicylsäure

240 mg Salicylsäure werden in 6,00 ml Methanol gelöst und in eine Original-Ampulle mit 100 µCi radioaktiver Salicylsäure, (Salicylic acid, carboxyl-C14, spezifische Aktivität 15,5 mCi/mM, The Radiochemical Centre, Amersham England) gegeben (= ^{14}C-Stammlösung). Davon werden nach vollständiger Lösung 2 ml entnommen und zur Trockne eingeengt.

Gehaltsbestimmung: spektralphotometrisch in Äthanol bei 305 nm = 77 mg Salicylsäure.

Aktivitätsbestimmung: die 77 mg Salicylsäure enthalten theoretisch 32,06 µCi. Gefunden: 32,15 µCi, das entspricht einer spezifischen Radioaktivität von 0,417 µCi/mg Salicylsäure. Für die vorgesehene Dosis von 8 mg Salicylsäure/Tier ergibt sich die Aktivität von 3,34 µCi.

5.2 Darstellung der ^{14}C-Salicylsäure-Cholsäure

160 mg Salicylsäure = 4 ml der ^{14}C-Stammlösung (siehe oben) werden auf 1 ml im Stickstoff-Strom eingeengt

und zu einer Lösung von 560 mg Desoxycholsäure (16,6% Überschuß) in 2 ml absoluten Methanol gegeben. Durch oberflächiges Verdunsten wird im Stickstoff-Strom auf 2 ml eingeengt. Die Auskristallisation erfolgt beim Abkühlen und wird durch 12-stündiges Stehen bei -20° vervollständigt.

Diese Eingefäßreaktion wird in einem Zentrifugenglas durchgeführt, um die Kristalle nach der Ausfällung durch Zentrifugieren besser von der Mutterlauge abtrennen zu können. Die Kristalle bleiben in dem Glas und werden 2 x mit 2 ml 70%igem Methanol (stark gekühlt) gewaschen.
Ausbeute: 60%
Gehaltsbestimmung: spektralphotometrisch in absolutem Äthanol bei 305 nm = 25,0% Salicylsäure im Addukt.

Aus der spezifischen Radioaktivität der Salicylsäure errechnet sich die Aktivität im Addukt zu 0,104 µCi/mg (entspricht 0,417 µCi/mg Salicylsäure).

Unabhängig davon wurde die spezifische Radioaktivität des Adduktes zu 0,111 µCi/mg Salicylsäure-Choleinsäure bestimmt (= 0,445 µCi/mg Salicylsäure). Die Übereinstimmung der spezifischen Aktivitäten bei beiden Bestimmungen - bezogen auf Salicylsäure - zu 0,417 und 0,445 µCi/mg liegt innerhalb des zu erwartenden Fehlers. Für die vorgesehene Dosis von 32 mg Addukt/Tier (≙ 8 mg Salicylsäure) ergibt sich die Aktivität von 3,56 µCi.

5.3 Tierversuche

Als Versuchstiere wurden weibliche Albinoratten (Wistar 64, Schwenke Nauheim) mit einem Gewicht von 155g - 185g verwendet. Zur Vorbereitung auf den Versuch und während des Versuches gab es Futter und Trinkwasser ad libitum.

5.3.1 Applikation

Die Salicylsäure, wie auch das Salicylsäure-Addukt wurden fein gepulvert und in 1,5 ml 10%igem Gummi arabicumschleim (ausgesuchte helle Ware) suspendiert. Die orale Applikation erfolgte mittels einer 8 cm langen geraden Metallsonde, die durch den Schlund bis in den Magen vorgeschoben wurde. In der angeschlossenen Dosierspritze befand sich die vorgesehene Suspension, die dann injiziert wurde.

5.3.2 Blutentnahme und Aufbereitung der entnommenen Blutproben

Die Blutentnahme erfolgte aus dem retroorbitalen (oder retrobulbären) Venenplexus. Diese Art der Probeentnahme ist besonders geeignet, da sie ohne größere Schädigung des Tiers vorgenommen werden kann und bei längeren Serienuntersuchungen am selben Tier zu keinem unnötigen Blutverlust beiträgt.

Man führt dabei eine zu einer Kapillare ausgezogene Pipette in den inneren Lidwinkel eines Auges und durchstößt nach 2 bis 3 mm unter leichtem Druck und Rotieren die Tenonsche Kapsel. Nach weiteren 2 mm eröffnet man den retroorbitalen Venenplexus. Dabei tritt das Blut sofort in die Kapillare ein. Die Ratte wird durch den Griff zweier Finger zwischen Kopf und Rumpf gehalten und zum Zeitpunkt der Blutentnahme auf den Hals ein geringer Druck ausgeübt. Die dadurch erzeugte leichte venöse Stauung begünstigt die Blutentnahme.

Eine Wiederholung des Eingriffs ist in kürzesten Abständen möglich, sodaß die für die Versuche benötigte

Menge von 0,2 - 0,4g Blut immer zur Verfügung steht.(53) Die Blutentnahme aus der Schwanzvene durch Anschneiden des Schwanzes und Anlegen eines Vakuums eignet sich nach meinen Erfahrungen nicht für Serienuntersuchungen. Die dabei anfallenden Blutmengen sind zu gering und gerinnen sehr schnell. Diese anfänglich gewählte Probenahme wurde daraufhin fallengelassen.

Das mit der Kapillare entnommene Blut wurde sofort in ein Scintillationsfläschchen aus Glas gebracht und genau gewogen. In dem Glas befanden sich ca. 0,1 mg Heparin-Na, um das Gerinnen des Blutes zu verhindern. Dadurch wurde das anschließende Auflösen wesentlich erleichtert. Zunächst überschichtet man mit 0,7 ml einer filtrierten frisch bereiteten gesättigten Lösung von Benzoylperoxid in Toluol und schüttelt kräftig. Dieser zum Bleichen der Probe unbedingt erforderliche Schritt sollte möglichst sofort nach der Blutentnahme und der Wägung erfolgen. Längere Wartezeiten, um z. B. mehrere Proben gleichzeitig aufzuarbeiten, sind deshalb zu vermeiden.

Zu der sich anschließenden Auflösung (Digestion) der Proben eignen sich vor allem organische Basen. Erste Versuche mit Hyamin 10-X Hydroxid (Fa. Packard Instrument Company, Inc.), einer quaternären Ammoniumbase, zeigten nicht ausreichendes Auflösungsvermögen. Mit 3 ml SOLUENE 100 (Fa. Packard Instrument Company, Inc.) gelang die Digestion unter ständigem Schütteln (12 Stunden) im Wasserbad bei 40°. Die Scintillationszählgläser müssen dabei gut verschlossen bleiben, um das Verdunsten des Basenlösungsmittels, wie auch eine Verfärbung durch den Kontakt mit der Luft zu vermeiden.

Als Scintillationsflüssigkeit wurde 10 ml einer Lösung von 12 g PPO (2,5-Diphenylaxazol) in 1000 ml Toluol hinzugefügt.

5.3.3 Messung der Radioaktivität

Die radioaktiven Lösungen wurden im Flüssig-Scintillationszähler LS-150 der Firma B e c k m a n gemessen. Die unterschiedliche Löschung der Proben machte es notwendig, zunächst die Zählausbeute durch Eichung mit einem inneren Standard (^{14}C-Toluol) zu ermitteln. Mit Hilfe dieser Eichkurve konnten die weiteren Messungen mit dem in diesem Gerät vorhandenen externen Standard (^{137} Caesium) durchgeführt werden.

Die erzielten Zählausbeuten lagen zum überwiegenden Teil zwischen 15% und 50%. Der Grund dafür liegt in unterschiedlichen Einwaagen an Blut und der dadurch bedingten unterschiedlichen Färbung.

6. Selbstversuch

6.1 Versuchspersonen

In beiden Versuchsserien (Einnahme von reiner Salicylsäure und Salicylsäure-Choleinsäure) waren jeweils 10 gleiche Probanden beteiligt.

Person	1	2	3	4	5
Gewicht kg	80	69	72	85	77
Alter/Geschlecht	26/♂	26/♂	29/♂	26/♂	44/♂
Dosis Salicylsäure	100 mg	100 mg	250 mg	250 mg	500 mg
Dosis Salicylsäure-Choleinsäure	0,392g	0,392g	0,98g	0,98g	1,96g

Person	6	7	8	9	10
Gewicht kg	100	60	57	65	47
Alter/Geschlecht	29/♂	26/♀	27/♀	32/♀	28/♀
Dosis Salicylsäure	500 mg	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg
Dosis Salicylsäure-Choleinsäure	1,96g	0,98g	0,98g	0,98g	0,98g

6.2 Einnahme und Harnentnahmen

Bei der oralen Applikation erhielten 2 Probanden 0,1g (2♂), 6 Probanden 0,25g (2♂, 4♀) und 2 Probanden 0,5 (2♂) Salicylsäure in Form von 200 ml Natriumsalicylatlösung.
Die entsprechenden Salicylsäure-Choleinsäuremengen von 1,96g, bzw. 0,98g, bzw. 0,392g (Salicylsäuregehalt im Addukt 25,5%) wurden in einer Suspension von 200 ml 0,01 N Salzsäure verabreicht.
Die Einnahme erfolgte morgens nüchtern. Die erste Nahrungsaufnahme, 2 Stunden nach der Applikation, bestand aus einem kleinen Frühstück. Nach jeder Harnentnahme wurden 50 ml Wasser getrunken, ansonsten normale Kost ohne zusätzliche Flüssigkeit.
Vor der Gabe der Substanz wurden die Probanden angehalten, die Blase zu entleeren; diese Urinfraktion diente als Leerprobe.
Die Harnentnahme erfolgte zunächst in 4 mal $\frac{1}{2}$ stündlichen, dann in 8 mal stündlichen und bis zum Ende in 2 bis 5 stündlichen Abständen. Die Entnahme wurde nach Salicylsäureeinnahme über 24 Stunden, nach Salicylsäure-Choleinsäure-Applikation über 48 Stunden durchgeführt.

6.3 Bestimmung des Gesamtsalicylats im Harn

Im gesammelten Urin wurden die Gesamtsalicylate nach L e v y (50) bestimmt.
3,0 ml Harn werden mit 3,0 ml konzentrierter Salzsäure 16 Stunden bei 100° in einer geschlossenen Ampulle von 10 ml hydrolysiert. 2,0 ml des Hydrolysates werden mit 30,0 ml Tetrachlorkohlenstoff 5 Minuten extrahiert. 10 ml der organischen Phase werden mit 5,0 ml Fe (III)-Reagenzlösung unter fünfminutigem Schütteln zur Reaktion gebracht. Die Extinktion der wässrigen Phase wird bei 530 nm in 1 cm Küvetten nach 20 Minuten gemessen. Die Färbung ist insgesamt 60 Minuten stabil.
Fe (III)-Reagenzlösung: 5 ml Stammlösung (1,0g $Fe(NO_3)_2$ ad 100 ml 0,07 N HNO_3) werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Literaturverzeichnis

1. Schlenk jr., W., Fortschr. chem. Forsch. Bd. 2, 92 (1951)
2. Schlenk jr., W., Liebigs Ann. Chem. 565., 204 (1949)
3. Broser, W. und Lautsch, W., Naturwissenschaften 40., 220 (1953)
4. Cramer, F., Naturwissenschaften 38., 188 (1951) Chem. Ber. 84., 851 (1951)
5. Scheibe, G. und Brück, D., Z. Elektrochem. Ber. Bunsenges. physik. Chem. 54., 403 (1950)
6. Sobotka, H. and Kahn, S., Biochem. J. 26., 898 (1932)
7. Sobotka, H., Chem. Reviews 15., 340 (1934)
8. Frömming, K.-H., Arch. Pharmaz. Ber. dtsch pharmaz. Ges. 301., 548 (1968)
9. Frömming, K.-H., Dtsch. Apotheker Ztg. 109., 309 (1969)
10. Wieland, H. und Sorge, H., Hoppe-Seyler`s Z. physiol. Chem. 97., 1 (1916)
11. Latschinoff, P., Ber. dtsch. chem. Ges. 18., 3039 (1885)
12. Huntress, E. H. und Phillips, R. F., J. Amer. chem. Soc. 71., 458 (1949)
13. Rheinboldt, H., Braun, P., Flume, E., König, O. und Lauber, A., J. prakt. Chem. 153., 313 (1939)
14. Rheinboldt, H., König, O. und Otten P., Liebigs Ann. Chem. 473., 249 (1929)
15. Buu - Hoï, N. P., Hoppe-Seyler`s Z. physiol. Chem. 278., 230 (1943)

16. Shimizu, T. und Hatakeyama, T., Hoppe-Seyler`s Z. physiol. Chem. 182., 57 (1929)

17. Marx, W. und Sobotka, H., J. org. Chemistry 1., 275 (1936)

18. Rheinboldt, H., Pieper, H. und Zervas, P., Liebigs Ann. Chem. 451., 256 (1927)

19. Sobotka, H. und Goldberg, A., Biochem. J. 26., 555 (1932)

20. Cilento, G., J. Amer. chem. Soc. 72., 4272 (1950)

21. Cilento, G., J. Amer. chem. Soc. 73., 1355 (1951)

22. Lautsch, W., Bandel, W. und Broser, W., Z. Naturforsch. 11B, 282 (1956)

23. Cilento, G., J. Amer. chem. Soc. 74., 968 (1954)

24. Angelescu, E. und Nicolau, G., Rev. Roumaine Chim. 10., 355 (1965)

25. Rheinboldt, H., König, O. und Flume, E., Hoppe-Seyler`s Z. physiol. Chem. 184.,219 (1929)

26. Fieser, L. F. und Newmann, M. S., J. Amer. chem. Soc. 57., 1602 (1935)

27. Wakely, R. D., Am. Patent 2. 758. 923 vom 14. 8. 1956 ref.: C 1958, 7844

28. Go, Y. und Kratky, O., Hoppe-Seyler`s Z. physiol. Chem. B. 26., 439 (1934)
Kratky, O. und Giacomello, G., Mh. Chem. 69., 427 (1936)

29. Fischmeister, H., Mh. Chem. 85., 182 (1954)

30. Caglioti, V. und Giacomello, G., Gazz. chim. ital. 69., 245 (1939)

31. Sobotka, H. und Goldberg, A., Biochem. J. 26., 566, 905 (1932)

32. Sobotka, H., Naturwissenschaften 19., 595 (1931)

33. Schlenk jr., W., Experientia (Basel) 8., 337 (1952)

34. Wakely, R. D., Amer. Patent 2. 758 924. v. 14. 8. 1956; ref.: C. 1959, 6572

35. Almquist, H. J. und Klose, A., J. Amer. chem. Soc. 61., 745, (1939)

36. Schweiz. Pat. Nr. 214.046 v. 31. 3. 1941 ref.: C. 1942 I, 1781

37. Stepp, W., Kühnau, J., Schroeder, H., Die Vitamine und ihre klinische Anwendung, Bd. II S. 799 Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1957

38. Widenbauer, F., Krebs, U.,Mschr. Kinderheilkunde 91., 173, 223 (1942)

39. Cilento, G., J. med. pharm. Chem. 2., 241 (1960)

40. Pharmazeutische Stoffliste, 4. Auflage, 39. Lieferung, Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker, Frankfurt/M.

41. Nemitz, G., Z. Lebensmittel-Unters. und Forsch. 123., 1 (1963/64)

42. v. Czetsch-Lindenwald, H., zitiert nach Ritschel, W. A., Die Tablette EDITIO CANTOR Aulendorf 1966, s. 13

43. Speiser, P., Pharmac. Acta Helvetiae 41., 321 (1966)

44. Speiser, P., Scientia Pharmac. 37., 14 (1969)

45. Levy, G. und Hollister, L. E., J. pharmac. Sci. 53., 1446 (1964)
Levy, G. und Hayes, B. A., New England J. Med. 262., 1053 (1960)

46. Münzel, K., Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 293., 766 (1960)

47. Rauen, H. M., Biochemisches Taschenbuch 2. Teil S. 92/93, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964

48. Ritschel, W. A. und Orth, H., Pharmaz. Ind. 28., 454 (1966)

49. Münzel, K., Büchi, J. und Schultz, O.-E., Galenisches Praktikum, S. 465 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m. b. H. Stuttgart (1959)

50. Levy, G. und Procknal, J. A., J. pharmac. Sci. 57., 1330 (1968)

51. Forth, W., Rummel, W., Glasner, H. und Andres, H. : Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. exp. Pathol. 254., 364 (1966)

52. Feldmann, S., Wynn, R. J. und Gibaldi, M., J. pharmac. Sci. 57., 1493 (1968)

53. Möller, H. G., Klin. Wschr. 33., 770 (1955)

Lebenslauf

Am 23. 8. 1940 wurde ich in Rosenberg/OS als Sohn des Zollinspektors Rudolf Sandmann und seiner Ehefrau Hildegard geb Scholz geboren. Mein Vater ist am 2. Juli 1940 gefallen.

1945 waren wir gezwungen unsere Heimat zu verlassen und verzogen nach Alsleben/Saale. Nach Besuch der dortigen Grundschule kam ich in Worbis/Eichsfeld auf die Oberschule, deren sprachlichen Zweig ich bis zum Abitur im Juli 1958 besuchte. Da mir jede Möglichkeit zum Studium genommen wurde, verließen wir 1958 die SBZ. Nachdem ich in Delmenhorst das Abitur für die Bundesrepublik nachgeholt hatte, begann ich am 1. 4. 1959 in der Rats-Apotheke in Hamburg-Harburg die Praktikantenzeit. Im Februar 1961 bestand ich das pharmazeutische Vorexamen. Vom Sommersemester 1961 bis zur Pharmazeutischen Prüfung im Oktober 1964 studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen bei den Professoren W. Hückel und H. Auterhoff. Vom 1. 12. 1964 studierte ich in Hamburg in der Chemischen und Lebensmitteluntersuchungsanstalt bei Professor H. Werner Lebensmittelchemie. Nach dem Lebensmittelchemiker-Hauptexamen im Juli 1966 leistete ich meine Kandidatenzeit ab und besitze seit Februar 1967 die Approbation als Apotheker.

Im April 1967 begann ich am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität in Berlin unter Anleitung von Professor Dr. K. H. Frömming die vorliegende Dissertation.